

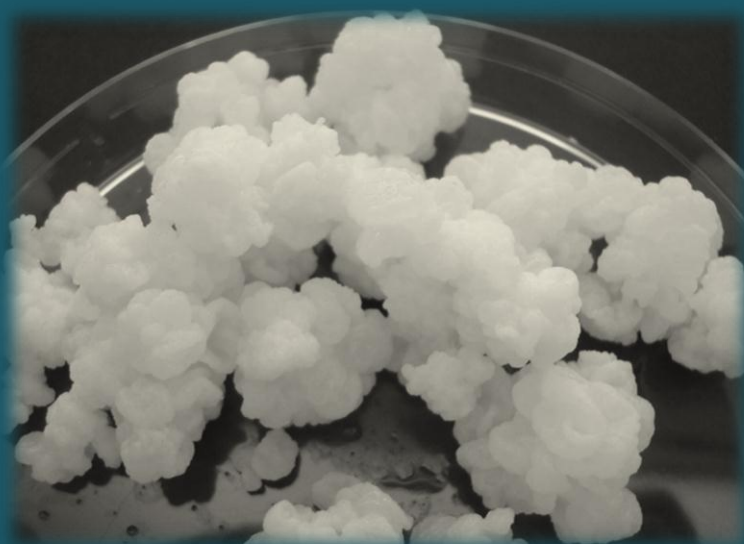
TESIS DOCTORAL

# Evaluación de la actividad biológica de leches fermentadas artesanales: Función de la fracción no microbiana

Lic. Carolina Iraporda

Directora: Analía G. Abraham

Co-directora: Graciela L. Garrote



# Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas



## Trabajo de Tesis Doctoral

*“Evaluación de la actividad biológica de leches  
fermentadas artesanales:  
función de la fracción no microbiana”*

Lic. Carolina Iraporda

Directora Dra. Analía G. Abraham

Codirectora Dra. Graciela L. Garrote



El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET; bajo la dirección de la Dra. Analía G. Abraham y la codirección de la Dra. Graciela L. Garrote.







Los resultados del presente trabajo, han sido publicados parcialmente en las siguientes instancias:

#### Publicaciones periódicas

- “The role of lactate on immunomodulatory properties of nonbacterial fraction of kefir”. Iraporda C., Romanin D.E., Rumbo M., Garrote G.L. & Abraham A.G. *Food Research International*, 2014, 62: 247–253.
- “Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells”. Iraporda C., Errea A., Romanin D.E., Cayet D., Pereyra E., Pignataro O., Sirard J.C., Garrote G.L., Abraham A.G. & Rumbo M. *Immunobiology*, 2015, 220(10): 1161–1169.

#### Actas de Congresos

- “Administración de kefir a ratones *germ-free* en un modelo de infección con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”. Iraporda C., Sandes S.H., Nunes A.C., Neumann E., Nicoli J.R., Garrote G.L. & Abraham A.G. Trabajo completo publicado en Actas del XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Argentina. Noviembre de 2015. ISBN 978-987-22165-7-3.

#### Posters en Congresos y reuniones científicas

- “Capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora in vitro de los productos de fermentación de leche con gránulos de kefir”. Iraporda C., Garrote G.L. y Abraham A.G. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos. MICROAL 2012. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2012.
- “Immunomodulatory properties of non bacterial fraction of kefir: role of organic acids”. Iraporda C., Rumbo M., Garrote G. L. y Abraham A.G. IV Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Octubre 2013.
- “Caracterización de la fracción no bacteriana de leche fermentadas con gránulos de kefir”. Iraporda C., Abraham A.G. y Garrote G.L. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina. Noviembre 2014.
- “Modulation of intestinal epithelial innate response by microbial fermentation products”. Iraporda C., Romanin D., Pereyra E., Pignataro O.P., Rumbo M., Abraham A.G. & Garrote G.L. Reunión Conjunta 2014 entre la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, Bs. As., Argentina. Noviembre 2014.
- “Lactate and short chain fatty acids modulate TLR-mediated activation of epithelial and myeloid cells in vitro”. Errea A., Iraporda C., Cayet D., Marchetti P., Kluza J., Abraham A.G., Garrote G.L., Sirard J.C. & Rumbo M. International Congress of Mucosal Immunity. Berlin, Alemania. Julio 2015.
- “Protective effect of lactate against TNBS-induced colitis in a murine model”. Iraporda C., Romanin D.E., Mulet A.P., Abraham A.G., Garrote G.L. & Rumbo M. IV Congress of LASID, FAIC, SAI. Ciudad de Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2015.



## Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a la ayuda de muchas personas que me han brindado medios, tiempo, dedicación, esfuerzo y aliento, sin los cuales no hubiera podido haber llevado a cabo esta Tesis.

En primer lugar quiero agradecerles a mis directoras por haberme guiado durante el desarrollo y escritura de este trabajo, por el conocimiento y el tiempo brindado, por transmitirme sus experiencias, confianza y apoyo en todo momento. Por su calidad humana. Por los momentos compartidos en el escritorio, por la calma y confianza que me transmitió Grace y el optimismo inigualable de Analía.

Muy especialmente quiero agradecerle a Martin Rumbo por su valioso aporte a mi trabajo, por integrarme a su grupo de investigación, por su calidad profesional y humana. Por motivarnos con nuevos experimentos y desafíos. Por darme la posibilidad de viajar y trabajar en el exterior. Por su paciencia y su buena predisposición.

A David por ayudarme con todos los ensayos *in vivo* (e *in vitro*!!), por su tiempo, por transmitirme su conocimiento, por su paciencia y su buena predisposición en todo momento.

A las autoridades del CIDCA por haberme permitido desarrollar este trabajo en este Centro de Investigación.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por la formación que me brindó y darme la posibilidad de acceder al grado de Doctor.

Al CONICET por otorgarme las becas que posibilitaron realizar este trabajo.

A mis compañeros y directores del grupo de microbiología del CIDCA. A los que estuvieron desde que empecé y hoy han seguido otros caminos, a los que aún están y los que se fueron integrando en estos años. A todos, por hacer más ameno el trabajo diario, por su tiempo y por aguantarme... sobre todo en esta última etapa! A todos les debo algunas páginas de este trabajo. A Lu y Ale, Aye, Judith, Mica, Fernanda, Jessica, Marina, Agus, Sabri, Gabriel, Felipe, Manuel, Nelson, Lina, Esteban, Mariana, Mariano, Paula, Ivanna, Pato, Gaby, Pablo M., Pablo P., Lucy, Graciela, Raúl, Ángela, Fernando, Andrea y María.

A todos los chicos del actual IIFP, ex LISIN, por estar siempre dispuestos a ayudarme y a buscar reactivos. Dentro de ellos especialmente a David, Agus y Griselda. A Lu, mi compañera y amiga desde que ingresamos a la facultad.

A todos los integrantes del CIDCA por su colaboración y buena predisposición.

A los integrantes de la Cátedra de Bromato y de Micro con quienes compartí mis primeros pasos en la docencia, por tenerme paciencia y los momentos compartidos.

A Claudio Reyes por ayudarme con las determinaciones por HPLC y a Fabricio Lareu por ayudarme con la preparación de cultivos celulares.

A mis amigas platenses Lu, Mari, Luz, Bel, Mica, Vale, Valen. Y mis amigas de la vida Olavarrienses Mica, Ro, Nati, Sofi y Flor, por todos los años de amistad y por estar siempre firmes apoyándome en cada desafío.

A mis papás, por saberme aconsejar, por alentarme sin pausa, por enseñarme sus valores, por ser un referente, un ejemplo de vida y un modelo a seguir; por incentivarme a nunca bajar los brazos, por brindarme una educación y por creer siempre en mí.

A mi abuela Abo, por todo el cariño y la contención que me brindó desde que me vine a vivir a La Plata. A mis hermanos Flopy y Gon, por su cariño, a Gon y Yesi por haberme regalado un hermoso sobrino en el momento justo!

A Fran por ser mi mejor compañía, por todo el tiempo que le robé... por estar siempre a mi lado conteniéndome y compartiendo el día a día, por tener siempre la palabra justa para hacerme sonreír. Por todo su cariño, ánimo, apoyo y confianza.

Y a todos los que de una u otra manera aportaron su granito de arena para la realización de este trabajo de tesis... de todo corazón...

¡¡MUCHAS GRACIAS!!

Índice	Pág.
<b>Introducción general</b>	<b>1</b>
1. Alimentos funcionales, probióticos, prebióticos y simbióticos. Marco legal	1
2. Productos lácteos como vehículo de microorganismos probióticos	6
3. Kefir	7
3.1. Efectos benéficos del kefir	9
<b>Objetivos generales</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1. Caracterización de la fracción no microbiana de kefir</b>	
<b>Introducción</b>	<b>15</b>
1. Leche fermentada con gránulos de kefir	15
<b>Objetivos</b>	<b>19</b>
<b>Materiales y métodos</b>	
1. Gránulos de kefir y condiciones de cultivo	21
2. Aumento de biomasa	21
3. Cinética de acidificación	21
4. Enumeración de microorganismos viables	22
5. Microscopía electrónica de barrido	22
6. Obtención de la fracción no microbiana de kefir	22
6.1. Caracterización de la fracción no microbiana de kefir	23
6.1.1. Determinación de azúcares en los productos fermentados: Cromatografía en capa fina	23
6.1.2. Cuantificación de azúcares totales en los productos fermentados	23
6.1.3. Determinación de ácidos orgánicos en los productos fermentados	24
6.1.4. Cuantificación de polisacárido en leche fermentada con gránulos de kefir	25
6.1.5. Aproximación del grado de hidrólisis de proteínas lácteas	26
6.1.5.1. Determinación de nitrógeno TCA soluble	26
6.1.5.2. Análisis del perfil electroforético	26
7. Evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis de las leches fermentadas con gránulos de kefir	27
7.1. Simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal	27
7.2. Análisis del perfil peptídico antes y después de la digestión simulada mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa	27
8. Análisis estadístico	27
<b>Resultados y discusión</b>	<b>29</b>

1.	Caracterización de los gránulos de kefir y los productos fermentados	29
1.1.	Gránulos de kefir	29
1.1.1	Aspecto macroscópico y microscópico de los gránulos	29
1.1.2.	Composición microbiológica de los gránulos de kefir	31
1.1.3.	Cinética de acidificación y aumento de biomasa	32
1.2.	Leches fermentadas con gránulos de kefir	34
1.2.1.	Composición microbiológica de los productos fermentados	34
1.2.2.	Composición química de la leche fermentada con gránulos de kefir	35
1.2.2.1.	Determinación del contenido de azúcares totales	35
1.2.2.2.	Cuantificación de ácidos orgánicos	37
1.2.2.3.	Cuantificación de exopolisacáridos en leches fermentadas	41
1.2.2.4.	Determinación del grado de proteólisis	42
1.2.2.4.1.	Evaluación de la aparición de productos de hidrólisis mediante la cuantificación de nitrógeno TCA soluble	43
1.2.2.4.2.	Evaluación de la proteólisis por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE)	45
1.2.2.4.3.	Caracterización de los fragmentos peptídicos en la fracción no microbiana de kefir mediante HPLC de fase reversa	47
1.2.3.	Digestibilidad de las leches fermentadas: Simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal <i>in vitro</i>	51
	<b>Conclusiones</b>	55

## CAPÍTULO 2. Actividad biológica de la fracción no microbiana de kefir

	<b>Introducción</b>	57
1.	Actividad biológica de microorganismos probióticos	57
	<b>Objetivos</b>	61
	<b>Materiales y métodos</b>	63
1.	Bacterias patógenas	63
2.	Células eucariotas	63
2.1.	Células Caco-2/TC-7	63
2.2.	Sistema reportero Caco-2 ccl20:luc	64
2.3.	Cultivo y mantenimiento de células eucariotas	64
3.	Efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus cereus</i>	65
4.	Ensayo de asociación/invasión de <i>Salmonella</i> a células epiteliales en cultivo	66
4.1.	Preincubación de <i>Salmonella</i> Enteritidis con la fracción no microbiana de kefir	66
4.2.	Preincubación de células con la fracción no microbiana de kefir	67
5.	Obtención, cuantificación y caracterización de flagelina	67

6.	Modulación de la respuesta inmune innata: sistema reportero Caco-2 ccl20:luc	69
6.1.	Ensayos por luminometría	69
7.	Evaluación de la integridad y viabilidad celular	71
7.1.	Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa	71
7.2.	Actividad deshidrogenasa mitocondrial	71
8.	Análisis de la expresión génica <i>in vitro</i>	72
8.1.	Extracción de ARN total	72
8.2.	Transcripción reversa	73
8.3.	PCR cuantitativa en tiempo real	74
9.	Análisis estadístico	76
	<b>Resultados y discusión</b>	77
	<b>A. Actividad antimicrobiana de la fracción no microbiana de kefir</b>	
1.	Efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre el crecimiento de <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus cereus</i>	77
2.	Estudio del crecimiento de patógenos en la fracción no microbiana de kefir concentrada	80
3.	Efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre la asociación/invasión de <i>Salmonella</i> a células Caco-2/TC-7	82
	<b>B. Actividad inmunomoduladora de la fracción no microbiana de kefir</b>	86
1.	Obtención, cuantificación y caracterización de flagelina	86
2.	Modulación de la respuesta inmune innata epitelial <i>in vitro</i> por la fracción no microbiana de kefir	88
2.1.	Ensayo en sistema reportero Caco-2 ccl20:luc	88
2.2.	Modulación de la expresión de ARNm de Ccl20 en células Caco-2/TC-7 por la fracción no microbiana de kefir	89
2.3.	Efecto de la fracción no microbiana frente a la estimulación del sistema Caco-2 ccl20:luc con IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$	90
3.	Viabilidad celular luego del tratamiento de los cultivos celulares con la fracción no microbiana de kefir	91
3.1.	Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa	92
3.2.	Actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial	93
4.	Efecto del tiempo de preincubación con la fracción no microbiana de kefir en la modulación de la respuesta inflamatoria	94
5.	Efecto de componentes aislados de la fracción no microbiana de kefir en la modulación de la respuesta inmune innata epitelial	95
6.	Modulación de la expresión génica en células Caco-2 ccl20:luc por lactato	100
7.	Efecto de la isomería	103
8.	Modulación de la respuesta inflamatoria intestinal <i>in vitro</i> por metabolitos de fermentación microbiana	104
	<b>Conclusiones</b>	109



**CAPÍTULO 3. Efecto del lactato en un modelo murino de inflamación intestinal**

	<b>Introducción</b>	111
1.	Enfermedades inflamatorias intestinales	111
2.	Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal	112
3.	Estrategias para la prevención de enfermedades inflamatorias intestinales	113
	<b>Objetivos</b>	117
	<b>Materiales y métodos</b>	119
1.	Animales utilizados y condiciones de alojamiento	119
2.	Modelo murino de colitis inducida por administración de ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico (TNBS)	120
2.1.	Administración de lactato en agua de bebida	120
2.2.	Administración de lactato intrarrectal	120
3.	Eutanasia y toma de muestras	121
4.	Translocación de microorganismos	121
5.	Cuantificación de IL-6 en suero	122
6.	Score de daño histopatológico	122
7.	Análisis de humedad y perfil de ácidos orgánicos en materia fecal	122
8.	Análisis estadístico	123
	<b>Resultados y discusión</b>	125
1.	Efecto de la administración de lactato en agua de bebida	125
2.	Efecto de la administración de lactato en agua de bebida en un modelo de colitis inducida por TNBS	127
3.	Efecto de la administración intrarrectal de lactato en un modelo de colitis inducida por TNBS	134
	<b>Conclusiones</b>	139

**CAPÍTULO 4. Estudio de los posibles mecanismos involucrados en la actividad biológica del lactato**

	<b>Introducción</b>	141
1.	Ácidos grasos de cadena corta y su rol en la salud	141
2.	Receptores acoplados a proteína G	142
3.	Control metabólico de la inflamación	144
	<b>Objetivos</b>	147
	<b>Materiales y métodos</b>	149
1.	Detección de GPR81 en líneas celulares de epitelio intestinal y en tejidos humanos	149
2.	Determinación de AMP cíclico intracelular	150
3.	Ensayo con Toxina pertussis	150

4.	Transfección de células de epitelio intestinal con lipofectamina 2000	150
4.1.	Caracterización de las transfecciones	151
5.	Efecto de inhibidores de la vía glicolítica, bloqueo de transportadores MCT en la activación de células Caco-2 ccl20:luc	152
6.	Análisis estadístico	153
	<b>Resultados y discusión</b>	155
1.	Expresión del receptor GPR81 en líneas celulares de epitelio intestinal y tejidos humanos	155
2.	Modulación de la respuesta inmune innata epitelial por lactato en distintas líneas celulares	157
3.	Evaluación del rol del receptor GPR81 en el efecto inmunomodulador del lactato: Determinación de AMPc intracelular y ensayo con toxina pertussis	158
4.	Efecto del lactato en la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB)	165
5.	Efecto de los inhibidores de la vía glicolítica y bloqueo de transportadores de lactato sobre la activación de células epiteliales	167
	<b>Conclusiones</b>	177
	<b>Conclusiones generales</b>	179
	<b>Apéndice</b>	183
1.	Medios de cultivo celular	183
2.	Electroforesis SDS-PAGE	184
2.1.	Soluciones stock	184
2.2.	Preparación de geles de poliacrilamida	184
2.3.	Armado de los geles, siembra de muestras, condiciones de corrida y coloración	185
2.4.	Electroforesis Tricina SDS-PAGE	186
2.4.1.	Condiciones de corrida	187
2.4.2.	Visualización de las proteínas	187
3.	Medios de cultivo de microorganismos	188
4.	Detección de IL-6 en suero mediante método de ELISA	190
4.1.	Soluciones y buffer	190
4.2.	Protocolo	190
5.	Preparación y tinción de cortes histológicos con Hematoxilina y Eosina	191
6.	Evaluación del metabolismo celular en macrófagos	191
	<b>Referencias bibliográficas</b>	193



# Introducción general

---

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Alimentos funcionales, probióticos, prebióticos y simbióticos. Marco legal

La historia de la alimentación se encuentra estrechamente relacionada con la evolución del hombre en su proceso de civilización. Como todos los seres vivos, el ser humano necesita alimentarse para vivir. Siempre se ha considerado al alimento como la fuente de donde obtener nutrientes y energía para que su organismo pueda cumplir sus funciones y vivir de forma sana (Angulo y col., 1995). En la actualidad, el considerable progreso experimentado por el conocimiento científico en nutrición y salud humana, ha ido acompañado de un creciente interés de la sociedad por dichas cuestiones. Sin embargo la idea de alimentos promotores de la salud data de épocas remotas. Hace más de dos mil años Hipócrates escribió: *“Que el alimento sea tu mejor medicina y que tu mejor medicina sea tu alimento”*. Actualmente, los especialistas definen al alimento como *“toda sustancia natural o procesada que se ingiere con el fin de satisfacer la incorporación de los nutrientes para el mantenimiento de las funciones vitales del organismo”*. Los avances en la investigación científica apoyan la idea de que la dieta además de satisfacer las necesidades nutricionales puede ejercer un papel beneficioso en algunas enfermedades (Otles & Cagindi, 2012). Existe una estrecha relación entre la alimentación y ciertas enfermedades crónicas no transmisibles, reconociéndose los efectos de la dieta sobre el desarrollo cognitivo y psicomotor, la inmunidad y el crecimiento, entre otros. Además, el enorme incremento del costo de la atención de la salud dado por la mayor esperanza de vida, el aumento del conocimiento científico, los avances logrados en tecnología alimentaria y en las investigaciones sobre nutrición, y los grandes cambios en el estilo de vida, han llevado a que cada vez resulte de mayor interés para los consumidores permanecer informados acerca de lo que consumen. Por ello, también, son cada vez más las personas que se preocupan por su cuidado y que buscan en el mercado productos que contribuyan a su salud y bienestar, en especial aquellos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer enfermedades. Estas tendencias estimulan a la industria a desarrollar constantemente nuevos productos fortificados, enriquecidos, o con agregados de sustancias bioactivas, así como alimentos libres de algún componente considerado nocivo (alérgenos, grasa, etc.) (ILSI Europe, 2002). En los últimos años se ha aceptado la existencia de un grupo

particular de alimentos, llamados **alimentos funcionales**. Si bien no existe una definición única consensuada de alimento funcional, según la Definición Operativa FUFOSE 1999 (UE-ILSI Europe) “*un alimento puede ser considerado funcional si logra demostrar científicamente que posee efectos beneficiosos para la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de sus propiedades nutricionales habituales, de modo tal que mejore el estado general de salud o reduzca el riesgo de alguna enfermedad o ambas cosas*”. Por lo tanto, los alimentos funcionales, no constituyen una entidad única, bien definida y correctamente caracterizada. Éstos abarcan diversos componentes, nutrientes y no nutrientes, que afectan a toda una gama de funciones corporales relacionadas con el estado de bienestar y salud, la reducción del riesgo de enfermedad, o ambas. No se trata de comprimidos ni cápsulas, sino de productos que forman parte de una dieta normal. Además, cabe aclarar que los alimentos funcionales no curan ni previenen por sí solos alteraciones ni enfermedades y sus efectos benéficos deben estar científicamente fundamentados.

Como respuesta al creciente interés de los consumidores en este tipo de alimentos, han aparecido también organismos regulatorios que buscan establecer normas y directrices que regulen el desarrollo y la publicidad de los alimentos funcionales. La Unión Europea ha creado una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (FUFOSE, del inglés, *Functional Food Science in Europe*) coordinada por el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, del inglés, *International Life Sciences Institute*) cuyo objetivo es desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de alimentos funcionales. Además la FUFOSE apoya el desarrollo de dos tipos de alegatos de salud, que se indican a continuación, con respecto a los alimentos funcionales:

1. TIPO A: Alegatos de “*mejora de función*” asociados a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y/o actividades biológicas que son modificadas por la ingesta del alimento.
2. TIPO B: Alegatos de “*reducción de riesgo de enfermedades*”, que se asocian al consumo de un alimento o de sus componentes para ayudar a reducir el riesgo de padecer una determinada enfermedad o afección, gracias a los nutrientes específicos que contenga o no contenga dicho alimento.

En nuestro país la definición de los alimentos funcionales es analizada por un grupo de trabajo de la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) desde el año 2009. Por otro lado, mediante una disposición del Ministerio de Salud de la Nación de fines del 2011 (Disposición 7730, Noviembre de 2011) ha sido implementada una “*Guía para la*

*Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos*", creándose además una Comisión Evaluadora para la autorización de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos. Es interesante remarcar que para poder incorporar una declaración de propiedades saludables a un producto, este documento establece que se analizarán "los estudios científicos, en humanos y otros estudios (*"in vivo"*, *"in vitro"* y *"ex vivo"*) que avalen la declaración, incluyendo evidencia favorable y desfavorable actualizada respecto de la misma", lo cual reafirma la necesidad de realizar estos estudios cuando se evalúa un ingrediente o alimento funcional.

Dentro de los alimentos funcionales se encuentran los alimentos adicionados de probióticos. El Código Alimentario Argentino en el Capítulo XVIII, Artículo 1389 (Resolución Conjunta SPReI N° 261/2011 y SAGyP N° 22/2011), al igual que la Organización Mundial de la Salud, FAO/WHO, 2002 (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*) definen a los **probióticos** como "microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor". Los alimentos probióticos son aquellos que contienen estos microorganismos en cantidad suficiente, en una matriz adecuada, de manera tal que después de su ingesta cumplan con el efecto postulado. El Código Alimentario Argentino, también define que, para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico debe cumplir con un protocolo de evaluación que contempla los siguientes aspectos:

1. Identificación de la cepa (Género/especie/subespecie)

2. Caracterización "*in vitro*" e "*in vivo*"

- ✓ Resistencia gástrica: ensayo realizado como indicador de que la cepa podrá atravesar la barrera biológica estomacal, arribando viable al intestino.

- ✓ Resistencia a bilis: ensayo realizado como indicador de resistencia de la cepa a esta barrera biológica del organismo, presente a nivel de duodeno.

- ✓ Resistencia a lisozima: ensayo realizado como indicador de que la cepa podrá sortear esta barrera biológica presente en la boca (saliva) e intestino delgado.

3. Ensayos "*in vivo*" e "*in vitro*" que demuestren el(los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s) debidamente documentados y respaldados en estudios efectuados por organismos nacionales y/o internacionalmente reconocidos.

4. Seguridad: La cepa probiótica no debe ser riesgosa para la salud. La bacteria en las concentraciones en que se encuentra en el alimento, no deberá promover la translocación

bacteriana hacia otros órganos. Además, para garantizar la seguridad del probiótico se deben realizar las siguientes pruebas: las cepas no deberán ser portadoras de genes de resistencia a antibióticos, no deberán presentar actividad hemolítica y no deberán ser productoras de toxinas.

Con la denominación de **alimento con probióticos**, se entiende aquel alimento con una carga de células viables que deberá estar comprendida entre  $10^6$  y  $10^9$  UFC/g durante su período de duración mínima. Los alimentos con probióticos pueden diseñarse monocepa, multicepa o multiespecie. Las preparaciones multiespecie bien diseñadas tienen ventajas derivadas del sinergismo entre los efectos específicos aportados por cada una de las especies probióticas (Abraham y col., 2005). Además, los productos conteniendo probióticos deben presentarse comercialmente en un envase bromatológicamente apto cuyo rótulo indique la identificación precisa de las cepas que lo compongan y la concentración de células viables de cada una de ellas. La mayoría de los probióticos que se emplean comercialmente pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En la Tabla 1 se listan las especies de probióticos más utilizados.

**Tabla 1:** Microorganismos empleados o propuestos como probióticos. Fuente: Champagne & Gardner, 2005; Prado y col., 2008.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Otras especies
<i>L. helveticus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Saccharomyces cereviceae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

El consumo de probióticos influye positivamente en la salud humana, sin embargo, el desarrollo de alimentos con probióticos no es tarea fácil ya que hay que considerar las características fisicoquímicas del alimento en el cual se piensan introducir, así como las condiciones de procesamiento a las que será sometido, para no perder la actividad probiótica de las bacterias utilizadas (Saxelin y col., 2003).



Por otro lado, también dentro del marco de los alimentos funcionales se encuentran los **prebióticos** que son definidos por el Código Alimentario Argentino en el Capítulo XVIII, Artículo 1390 (Resolución Conjunta SPReI N° 229/2011 y SAGyP N° 731/2011) como *“ingredientes alimentarios o partes de ellos (no digeribles) que posee un efecto benéfico para el organismo receptor, estimulando el crecimiento selectivo y/o actividad metabólica de una o de un número limitado de bacterias en el colon y que confiere beneficios para su salud”*. Son sustancias de naturaleza glucídica, el fundamento de acción es que no pueden ser digeridos en el tracto gastrointestinal proximal, debido a la inexistencia de enzimas digestivas capaces de hidrolizar las uniones glucídicas que presentan. Actúan como fibras solubles y son fermentados a nivel del colon, favoreciendo la actividad y estimulando del crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos. Los prebióticos más estudiados son la inulina, los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS) y los glucooligosacáridos tales como los  $\beta$ -glucanos (Gibson & Roberfroid, 1995). El efecto de los prebióticos depende mucho del tipo de microflora que el individuo posea (Schrezenmeir & De Vrese, 2001; Tojo Sierra & Leis Trabazo, 2003).

Finalmente, los **simbióticos** pueden definirse como la combinación de probióticos y prebióticos, éstos afectan benéficamente al huésped mejorando la supervivencia e implantación en el colon de los microorganismos vivos tomados de alimentos con probióticos y estimulando selectivamente el crecimiento o activando el metabolismo de un número limitado de bacterias promotoras de la salud (Schrezenmeir & De Vrese, 2001; Tojo Sierra & Leis Trabazo, 2003).

En este sentido, los “probióticos”, “prebióticos” y “simbióticos” son, dentro del amplio mundo funcional, los más estudiados y que más prometen para el futuro (Tojo Sierra & Leis Trabazo, 2003).

## 2. Productos lácteos como vehículo de microorganismos probióticos

Debido a su consumo y a su composición nutricional, los productos lácteos son utilizados como vehículos para los microorganismos probióticos y constituyen la alternativa comercial más popular hasta el momento, siendo la principal ventaja que el proceso de elaboración se adapta muy bien al agregado de bacterias probióticas. Para lograr que el cultivo tenga éxito como probiótico es necesario que pueda sobrevivir y desarrollarse en el medio durante la producción y el almacenamiento del producto, así como también debe resistir a las condiciones fisiológicas a la que se expone al ser consumido y debe llegar viable al intestino, donde ejerce su acción benéfica. Las leches fermentadas se han utilizado ampliamente como base para el desarrollo de alimentos funcionales con probióticos. Los cultivos probióticos pueden ser inoculados al iniciar la fermentación o ser adicionados al producto al finalizar la misma. También se utilizan como vehículo de probióticos los quesos frescos y leches, entre otros. En la Figura 1 se presentan algunos ejemplos de alimentos lácteos con probióticos disponibles en el mercado en nuestro país.



El Código Alimentario Argentino en el Capítulo VIII, Artículo 576 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006) establece la definición de **leches fermentadas** como “productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez”. Existe una amplia variedad de leches fermentadas que se diferencian según los microorganismos que intervienen en su obtención, los procedimientos de elaboración, los tipos de materia prima, etc.

### 3. Kefir

El kefir es una bebida láctea fermentada artesanal, viscosa, de sabor ácido, levemente efervescente y con un aroma característico (Garrote y col., 2001). Es producida por fermentación de leche con gránulos de kefir. Se encuentra descrito en el Código Alimentario Argentino, en el apartado de Leches Fermentadas-Artículo 576-(Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006) donde se lo define como “producto incluido en la definición de leche fermentada, cuya fermentación se realiza con cultivos ácido lácticos elaborados con granos de kefir, *Lactobacillus kefir*, especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kefir están constituidos por levaduras fermentadoras de lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cereviceae* y *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. y *Streptococcus thermophilus*”.

Los gránulos de kefir son masas gelatinosas, irregulares, color blanco o ligeramente amarillento, y consistencia elástica. Su tamaño es variable oscilando desde pocos milímetros a 2 o 3 centímetros de diámetro y su forma semejante a las flores de coliflor (Figura 2). En los gránulos, se encuentran inmersas e inmovilizadas bacterias ácido lácticas ( $10^8$ - $10^9$  UFC/g de gránulo), levaduras ( $10^7$ - $10^8$  UFC/g de gránulo) y bacterias ácido acéticas ( $10^5$ - $10^6$  UFC/g de gránulo) (Koroleva, 1991; Garrote y col., 2010). Cuando los gránulos de kefir son adicionados a la leche, parte de los microorganismos pasan a ella donde se multiplican y producen metabolitos que otorgarán a la leche fermentada sus características químicas y físicas particulares. La composición del kefir, así como sus características organolépticas están sujetas a variaciones regionales. Está documentado que éstas variaciones pueden

deberse a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos de kefir, el tipo de leche utilizada, así como a las condiciones de elaboración del producto siendo relevantes la relación gránulo/leche y la temperatura de fermentación (Witthuhn y col., 2005; Latorre García Fontán y col., 2006).



**Figura 2:** Aspecto macroscópico de gránulos de kefir

No se conocen los mecanismos por los cuales se originaron los gránulos de kefir (Koroleva, 1988). Estos se forman solamente a partir de otros gránulos preexistentes y en el laboratorio no ha sido posible formar un nuevo gránulo partiendo de la asociación de cepas aisladas de los mismos (Bottazzi y col., 1994). Se cree que los gránulos se originaron debido a prácticas de las tribus de la región del Cáucaso, quienes dejaban fermentar la leche en recipientes hechos con el estómago de animales, donde la transportaban. Sin llegar a consumir totalmente el producto, el saco era nuevamente recargado con leche, repitiendo el proceso durante mucho tiempo. Esta práctica puede haber permitido la reunión de los microorganismos y formación de la asociación simbiótica propia del kefir (Bottazzi & Bianchi, 1980). La composición microbiológica del kefir es compleja y se han aislado una gran variedad de microorganismos tanto de los gránulos como de la leche fermentada. Entre los géneros de bacterias encontradas en kefir pueden destacarse: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Acetobacter* (Koroleva, 1991; Angulo y col., 1993; Dousset & Caillet, 1993; Takizawa y col., 1994; Yoshida & Toshosima, 1994; Pintado y col. 1996; Lin y col. 1999; Garrote y col., 2001; Simova y col. 2002; Santos y col., 2003; Garbers y col., 2004; Yüksesdag y col., 2004a; Witthuhn y col., 2005; Delfederico y col., 2006; Chen y col., 2008; Jianzhong y col., 2009; Miguel y col., 2010; Magalhães y col., 2010, 2011a; Kok-Tas y col., 2012). Las levaduras en el kefir no han sido estudiadas tanto como las bacterias, aunque proporcionan claramente un entorno favorable para el crecimiento de bacterias, además producen metabolitos como etanol y CO<sub>2</sub> que contribuyen al sabor y a la

sensación en la boca característica del kefir (Farnworth, 2005). Entre los géneros de levaduras halladas en kefir se destacan *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulaspora*, *Issatchenkia*, *Kazachstania* y *Zygosaccharomyces* (Koroleva, 1991; Rohm y col., 1992; Angulo y col., 1993; Dousset & Caillet, 1993; Yoshida & Toshosima, 1994; Garrote y col., 1997; Motaghi y col., 1997; Wyder y col., 1997; Simova y col., 2002; Loretan y col., 2003; Witthuhn y col., 2005; Latorre Garcia y col., 2007; Wang y col., 2008; Jianzhong y col., 2009; Magalhães y col., 2010, 2011a; Diosma y col., 2014).

### 3.1. Efectos benéficos del kefir

El kefir presenta propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a la presencia de una microbiota compleja así como a sus productos metabólicos. Dentro de estos productos se pueden mencionar: ácidos orgánicos, vitaminas (fundamentalmente del grupo B), etanol, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo, proteínas de superficie de algunos microorganismos que se liberan al medio (capa S) y exopolisacáridos (Golowczyc y col., 2007; Medrano y col. 2008; Garrote y col., 2010). Las propiedades funcionales y probióticas del kefir o de microorganismos aislados de los gránulos han sido estudiadas por numerosos autores y se resumen a continuación algunos de los hallazgos más relevantes.

**Propiedades antimicrobianas.** Garrote y col. (2000) estudiaron la actividad antibacteriana del kefir, demostrando la capacidad inhibitoria de sobrenadantes de leche fermentada contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Otros autores también demostraron actividades antibacterianas de sobrenadantes de productos fermentados con kefir o con microorganismos aislados a partir de ellos (Brialy y col., 1995; Santos y col., 2003; Yüksekdag y col., 2004b; Rodrigues y col., 2005, Silva y col., 2009). Kakisu y col. (2007) probaron que el kefir disminuye la viabilidad y la germinación de esporas de *Bacillus cereus*. También se demostró su actividad antifúngica (Cevikbas y col., 1994; Ismaiel y col., 2011).

**Antagonismo contra patógenos intestinales.** Estudios *in vitro* sobre células epiteliales intestinales han demostrado que microorganismos aislados de kefir poseen capacidad de antagonizar el efecto de patógenos intestinales, tales como *Escherichia coli*, *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. Se ha probado que cuando *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, aislado de kefir, es incubado sobre cultivos de la línea celular Hep-2 previene la unión de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y minimiza las alteraciones causadas por el patógeno sobre los enterocitos. Este efecto no es dependiente de la viabilidad del probiótico y no puede ser explicado por exclusión competitiva (Hugo y col., 2008). Estudios posteriores demostraron que el antagonismo de esta cepa sobre la virulencia de *E. coli* se relaciona con su capacidad

de inhibir los efectos citotóxicos de la toxina Shiga 2 producida por EHEC (Kakisu, 2010). También se ha demostrado la capacidad cultivos mixtos de bacterias (*L. plantarum* 83114 y *Lc. lactis* 8221, *L. kefir* 8348) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* 8112 y *Kluyveromyces marxianus* 8154) aislados de kefir de prevenir la invasión de *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri* a células en cultivo Hep-2 y de reducir los daños celulares causados por el patógeno (Bolla y col., 2016). Cepas de *Lactobacillus kefir* son capaces de inhibir la adhesión e invasión de *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium a células Caco-2/TC-7, a través de la liberación al medio de cultivo de proteínas de capa-S. Este efecto es dependiente de la cepa en estudio y de las características de la capa-S producida (Golowczyc y col., 2007; Mobili y col., 2010). En Rusia, el kefir ha sido estudiado para el tratamiento de pacientes con úlceras en el estómago e intestino humanos (Farnworth & Mainville, 2008). Londero y col. (2015) demostraron que las propiedades antagónicas contra *Salmonella* de un cultivo mixto de cepas aisladas de gránulos de kefir (*L. plantarum* 83114, *L. kefir* 8348 y *K. marxianus* 8154) se mantienen después de su desarrollo en suero de leche.

**Modulación de la respuesta inmune.** Vinderola y col. (2005) estudiaron la capacidad inmunomoduladora del kefir indicando la importancia de la viabilidad de los microorganismos y de la dosis administrada a ratones en la producción de citoquinas reguladoras de la respuesta inmune. Vinderola y col. (2006b) también analizaron el efecto del kefir completo y de la fracción libre de células y describieron que ambas fracciones indujeron perfiles de citoquinas similares, mientras que la fracción libre de células produjo un mayor incremento del porcentaje de células productoras de IL-10, involucrada en mecanismos antiinflamatorios.

Muchos microorganismos aislados de kefir han demostrado tener actividad inmunomoduladora. Romanin y col. (2010) demostraron la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial *in vitro* de la cepa *Kluyveromyces marxianus* 8154 y resaltaron la necesidad de que la levadura se encuentre viable para ejercer el efecto. Hong y col. (2009) demostraron la capacidad inmunomoduladora *in vitro* de lactobacilos, focalizando su estudio en la secreción de las citoquinas proinflamatorias. Carasi y col. (2015) demostraron que la administración a ratones de la cepa *L. kefir* 8348, modula la expresión de mediadores proinflamatorios y aumenta las moléculas anti-inflamatorias tanto en sitios inductivos como efectores del sistema inmune. Del mismo modo, informaron un incremento en la producción de IgA y mucina por lo que este probiótico puede resultar importante en regulación de la homeostasis.

Además, Medrano y col. (2011) demostraron que el polisacárido de los gránulos de kefir (kefiran) administrado a ratones en el agua de bebida produce una modificación del balance



de células del sistema inmune asociado a mucosas, aumentando el número de células productoras IgA y macrófagos.

**Inhibición del crecimiento de tumores.** El papel anticancerígeno de los productos lácteos fermentados se puede atribuir, en general, a la supresión de tumores en fase inicial, por el retraso de la actividad de las enzimas que convierten los compuestos pro-cancerígenos a carcinógenos, o por la activación del sistema inmune (Sarkar, 2007). Se ha comprobado que la ingesta oral de kefir produce una reducción del crecimiento de tumores en ratones, este efecto se ha asociado con la inducción de procesos apoptóticos de las células tumorales y con la respuesta inmune inducida por componentes de la fracción soluble de kefir, particularmente polisacáridos (Shiomi y col., 1982; Liu y col., 2002; Hlastan-Ribič y col., 2005; De Moreno y col., 2007).

**Metabolismo del colesterol.** Estudios *in vivo* arrojan resultados contradictorios respecto al efecto anticolesterolémico del kefir. Por un lado Liu y col. (2006) mostraron que el kefir, producido en leche de vaca y de soja, disminuye la concentración de colesterol y de triglicéridos en suero en hámsters. Sin embargo, Urdaneta y col. (2007) hallaron un incremento en los niveles de colesterol y triacilglicerol en ratas que consumieron kefir. St-Onge y col. (2002) describieron que el consumo de kefir en sujetos con hipercolesterolemia no produjo efecto alguno sobre los niveles de colesterol total, y tampoco sobre la concentración de colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos. Por otro lado estudios *in vitro* que emplean una cepa de *Lactobacillus acidophilus* CU 673 aislado de kefir, demostraron que presenta capacidad de asimilar colesterol (Yoon y col., 1999) y *Kluyveromyces marxianus* es capaz de capturarlo en su pared celular (Yoshida y col., 2005). Una manera indirecta de ejercer el efecto hipocolesterolémico consiste en disminuir el contenido del mismo en la leche fermentada, tal como describieron Vujicic y col. (1992). Estos autores demostraron que la fermentación de la leche con gránulos de kefir redujo los niveles de colesterol presentes en la misma en hasta un 62 %.

**Efecto antihipertensivo.** Quirós y col. (2005) revelaron que kefir elaborado a partir de leche de cabra inhibe a la enzima transformadora de la angiotensina *in vitro* por la presencia de péptidos de bajo peso molecular producidos por la proteólisis durante la fermentación.

**Reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa.** La intolerancia a la lactosa es la incapacidad de digerir completamente la lactosa asociada con una actividad insuficiente de la enzima  $\beta$ -galactosidasa intestinal y afecta a aproximadamente un 75 % de la población adulta mundial (Scrimshaw y col., 1988). El kefir presenta actividad  $\beta$ -galactosidasa que permanece cuando el producto es consumido (De Vrese y col., 1992). Estudios llevados a

cabo en humanos indican que el consumo de kefir es capaz de mejorar la digestibilidad de la lactosa (Hertzler & Clancy, 2003).



## OBJETIVOS GENERALES

Los efectos funcionales que se asocian al consumo de kefir pueden atribuirse tanto a la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras probióticas, así como también a los productos metabólicos que aparecen en el medio de fermentación como consecuencia del desarrollo de los microorganismos y/o a modificaciones de la matriz del alimento en el cual se encuentran. Se planteó como **objetivo general** del presente trabajo analizar la actividad biológica benéfica para la salud de leches fermentadas con gránulos de kefir, focalizando el estudio en la fracción no microbiana.

Se propusieron como **objetivos específicos** los detallados a continuación:

1. Caracterizar la fracción no microbiana de leches fermentadas con gránulos de kefir.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de la fracción no microbiana de kefir.
3. Evaluar el efecto protector de componentes de la fracción no microbiana de kefir en un modelo murino de inflamación intestinal.
4. Estudiar los posibles mecanismos subyacentes a la actividad biológica de componentes de la fracción no microbiana de kefir.



# Capítulo 1

---

Caracterización de la fracción no  
microbiana de kefir

## INTRODUCCIÓN

### 1. Fermentación de leche con gránulos de kefir

Hoy en día se habla de tres formas de preparación del kefir: el proceso artesanal, el proceso comercial mediante el “Método de Rusia” y el proceso industrial que utiliza cultivos puros (Otles & Cagindi, 2003; Farnworth, 2005; Rattray & O'Connel, 2011).

La producción artesanal tradicional consiste en la inoculación de la leche previamente pasteurizada con una cantidad variable de gránulos de kefir. Luego de un período de fermentación de entre 18 a 24 h, a 20-25 °C, los gránulos se separan por filtración en una malla plástica y se pueden utilizar para una nueva fermentación, mientras que la bebida se almacena a 4 °C, lista para el consumo con el agregado de aditivos tales como azúcar, miel, cereales o frutas, a gusto del consumidor. El gránulo debe mantenerse intacto como *starter* para la producción de infinitos lotes de kefir, dadas las condiciones ambientales adecuadas (Beshkova y col., 2002; Otles & Cagindi, 2003; Farnworth & Mainville, 2008). El kefir presenta un perfil microbiano diferente al encontrado en el gránulo, la concentración de inóculo inicial de gránulos (relación g gránulo/ml de leche) afecta tanto el pH, como la viscosidad, la concentración de lactosa y el perfil microbiológico del producto final (Garrote y col., 1998; Simova y col., 2002). La agitación durante la fermentación también influye en la composición microbiana kefir, favoreciendo el desarrollo de lactococos homofermentativos y levaduras (Tamime, 2006; Farnworth & Mainville, 2008; Rattray & O'Connel, 2011).

El segundo método, conocido como el "Método de Rusia", permite la producción de kefir en una escala mayor, éste utiliza un proceso de fermentación en serie, desde el producto resultante de la primera fermentación de los gránulos (cultivo madre) (Farnworth & Mainville, 2008; Rattray & O'Connel, 2011). El proceso industrial consiste en la inoculación de la leche con cultivos puros aislados de gránulos de kefir y cultivos comerciales (Beshkova y col., 2002; Tamime, 2006; Rattray & O'Connel, 2011). Aunque la bebida comercial está disponible en muchos países, no todas las propiedades del kefir tradicional están siempre presentes (Lopitz-Otsoa y col., 2006; Farnworth & Mainville, 2008). El uso de cultivos comerciales puede estandarizar la producción industrial de kefir, además, si la selección de especies y cepas de bacterias y levaduras se lleva a cabo con precisión, se puede producir la bebida "Tipo Kefir" con sabor aceptable y buenas propiedades de conservación (Beshkova y

col., 2002). Asimismo esta bebida puede tener un período de vida comercial de hasta 28 días, mientras que el kefir elaborado con gránulos de manera tradicional debe consumirse entre 3-7 días luego de su preparación. Sin embargo, la bebida industrial "Tipo Kefir" no presenta las mismas propiedades probióticas presentes en el kefir elaborado de manera tradicional (Rattray & O'Connel, 2011).

Aunque la leche de vaca es el sustrato más común, el kefir también puede elaborarse a partir de leche de cabra y de oveja (Wójtowski y col., 2003; Hayaloglu y col., 2011). También se ha demostrado que los gránulos pueden utilizarse para la fermentación de otros sustratos, tales como leche de soja (Liu & Lin, 2000; Kesenkaş y col., 2011; Pourahmad y col., 2011) y leche de coco (Otlés & Cagindi, 2003). Estas bebidas, si bien producen un producto fermentado con propiedades probióticas, tienden a dejar el gránulo de kefir en un estado debilitado, siendo necesario que los gránulos sean devueltos a la leche de vaca para su recuperación. Los gránulos también pueden fermentar suero de leche manteniendo su integridad en este sustrato (Rimada & Abraham, 2001, 2003; Magalhães y col., 2011b; Londero y col., 2012).

En la Figura 1.1 se presentan algunos ejemplos de productos comerciales "tipo kefir" disponibles en el mercado en distintas regiones del mundo. En nuestro país el kefir se elabora de la forma tradicional, artesanalmente.



La composición química del producto fermentado, puede presentar cierta variación ya que la proporción en la que se inoculan los gránulos y el tipo de leche afectan a las propiedades del producto final. Este producto derivado de la leche posee los componentes nutritivos de la misma y los productos de la fermentación microbiana. Wszolek y col. (2001) estudiaron el

kefir obtenido en leche bovina, caprina y ovina, encontrando que la composición química del kefir no difiere de la composición de la leche de partida. Describieron que los sólidos totales variaron entre 10,6-14,9 % (p/p), las proteínas entre 2,9-6,4 % (p/p), las cenizas entre 0,7-1,1% (p/p) y los carbohidratos entre 3,8-4,7 % (p/p), coincidiendo con la composición de kefir de leche bovina informada por Otles y Cagindi (2003) y Magalhães y col. (2011a). El parámetro que presenta mayor variación es el contenido de lactosa que depende del tiempo de fermentación (Garrote y col., 2001; Rimada & Abraham, 2001).



## OBJETIVOS

La caracterización de los cambios en la composición de la leche debido a la acción de los microorganismos es una etapa necesaria en el estudio e identificación de los componentes responsables de los atributos saludables del kefir. Por ello, el objetivo del presente capítulo fue obtener y caracterizar la fracción no microbiana de leche fermentada con gránulos de kefir.

### Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de gránulos de kefir en leche descremada comercial y la acidificación de la leche.
- Estudiar el consumo de lactosa, la producción de ácidos orgánicos y exopolisacáridos durante la fermentación de leche con gránulos de kefir.
- Analizar el grado de hidrólisis de proteínas lácteas durante la fermentación mediante el estudio del contenido de nitrógeno TCA soluble, los perfiles electroforéticos de proteínas y los perfiles cromatográficos de los péptidos obtenidos.
- Evaluar la susceptibilidad del producto fermentado a ser hidrolizado por enzimas digestivas.





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Gránulos de kefir y condiciones de cultivo

Se utilizaron gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 pertenecientes a la colección del CIDCA conservados a -20 °C en leche. Los mismos se inocularon en leche descremada comercial UHT (La Serenisima, Argentina) en relación gránulos/leche 10% p/v y se mantuvieron activos mediante repiques sucesivos en leche a 20 °C durante 24 o 48 horas según el ensayo. Luego de cada subcultivo, los gránulos se retiraron del producto fermentado mediante filtración con un colador plástico, se lavaron con agua destilada y se inocularon nuevamente en leche para iniciar otro ciclo de fermentación. Las leches fermentadas se conservaron a -20 °C hasta ser analizadas.

### 2. Aumento de biomasa

Se analizó el aumento de biomasa de gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10. Para ello, luego de cada ciclo de fermentación de 24 horas a 20 °C los gránulos, fueron removidos del medio por filtración, lavados con agua destilada y secados sobre un papel absorbente hasta peso constante. Luego se registró su peso ( $\pm 0,01$  g) y se calculó la tasa de crecimiento como el aumento de peso por cada gramo de gránulo en cada subcultivo.

$$\text{Aumento de biomasa} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial}$$

### 3. Cinética de acidificación

Se estudió la acidificación de la leche durante la fermentación con gránulos CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10. Para ello, se inoculó leche descremada comercial UHT con los distintos gránulos en relación 10 % p/v y se incubó a 20 °C. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml cada 1 hora y se midió el pH con pHmetro modelo pH211 asociado a un microelectrodo HI 1131B (Hanna Instrument, USA).

#### **4. Enumeración de microorganismos viables**

Para determinar la concentración de microorganismos viables en gránulos de kefir y productos fermentados se llevaron a cabo diluciones apropiadas en triptona 0,1 % p/v y se realizaron recuentos en placa empleándose agar MRS (ver Apéndice) para bacterias ácido lácticas (BAL) y agar YGC (ver Apéndice) para levaduras. Los gránulos de kefir fueron previamente disgregados en un mortero estéril. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia (UFC)/g para los gránulos de kefir y UFC/ml para los productos fermentados.

#### **5. Microscopía electrónica de barrido**

Para el análisis de gránulos de kefir por microscopía electrónica de barrido (MEB) se cortaron porciones de 1 a 2 mm de gránulos frescos. Los mismos fueron fijados durante 20 h con glutaraldehído (Riedel de Haen, Seelze, Germany) al 2 % v/v en buffer fosfato pH 7. Luego se llevó a cabo la deshidratación en soluciones crecientes de etanol (20, 50, 70, 90 y 100 %) en PBS, colocándose las muestras 1 h en cada concentración. Las muestras fueron montadas en tacos metálicos y cubiertas con Au 24 durante 10 min por evaporación en vacío (Fine Coat, Sputer JFC 1100). La observación se realizó en un microscopio electrónico de barrido Philips SEM 505 que cuenta con un programa para la obtención de imágenes digitales (Digitalizador de Imagen Soft Imaging System ADDA II (SIS)).

#### **6. Obtención de la fracción no microbiana de kefir**

Para la obtención de la fracción no microbiana de kefir, la leche fermentada se centrifugó a 10000 xg durante 15 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., USA). El sobrenadante obtenido, para ciertos experimentos, se neutralizó mediante el agregado de NaOH 5N, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones y se filtró con membrana de 0,45 µm (Osmonics) para obtener el sobrenadante libre de células. Para ensayos específicos, este producto se congeló a -80 °C y se liofilizó utilizando un liofilizador Heto FD4 con una bomba de vacío Vacuubrand RZ 5 y un condensador que se mantiene a -50 °C, con el fin de separar el agua por sublimación. El producto se resuspendió en PBS para obtener una solución 5 veces concentrada (en relación de volúmenes).

## 6.1. Caracterización de la fracción no microbiana de kefir

### 6.1.1. Determinación de azúcares en los productos fermentados: Cromatografía en capa fina

Se analizó la composición de los azúcares presentes en los productos fermentados mediante cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en ingles: *Thin Layer Chromatography*) en placas de Silica gel G (Merk D-64271, Alemania). Previo a la siembra las placas se activaron 5 min en estufa a 100 °C. La siembra se efectuó utilizando una microjeringa Hamilton colocando 3 µl de cada muestra en alícuotas de 1 µl cada una, esperando la evaporación del solvente luego de cada alícuota, se aceleró el proceso utilizando una corriente de aire caliente (Southgate, 1976). Conjuntamente con las muestras, se sembraron patrones de glucosa, lactosa y galactosa. Los patrones se prepararon al 0,05 % p/v en solución etanol:agua (50:50). Una vez concluida la siembra las placas se colocaron en una cuba cerrada conteniendo el solvente de corrida o fase móvil (mezcla de n-propanol-acido acético-agua en relación 70:20:10), con atmosfera saturada en el mismo. Se permitió el avance de fase móvil hasta una distancia de 2 cm de la parte superior de la placa, se retiraron las mismas de la cuba y se secaron antes del revelado. Las placas se revelaron con una solución de ácido *p*-aminobenzoico 7g/l y ácido *o*-fosfórico 30 g/l en metanol (Zweig & Sherma, 1978); se evaporó el solvente revelador y se colocaron 5 min en estufa a 100°C para permitir la visualización de las marcas correspondientes a los hidratos de carbono. Se midió la constante  $R_f$  (*Ratio of Front*), la cual es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre la placa como una fracción decimal y mide la retención de un componente. Se calculó el valor de  $R_f$  aplicando la siguiente relación: Distancia de la muestra desde el punto de siembra/distancia de la fase móvil desde el punto de siembra.

### 6.1.2. Cuantificación de azúcares totales en los productos fermentados

La concentración de azúcares totales en la fracción no microbiana de kefir obtenida por fermentación durante 24 y 48 h se realizó mediante el método de Antrona-sulfúrico (Southgate, 1976). La mayoría de los carbohidratos se pueden determinar mediante este método, pero en las condiciones descritas a continuación es específico para hexosas. Todos los polisacáridos reaccionan en medio ácido fuerte dando un cromógeno (furfural y derivados) que condensan con el cromóforo (reactivo) para dar color. Para efectuar la valoración 0,2 ml de solución patrón, muestra o diluciones apropiadas de las mismas se colocaron en tubos de vidrio con tapa. Se adicionaron 2 ml de reactivo de Antrona, se agitó empleando un vortex y se llevó a baño de agua a ebullición durante 15 min. Luego se enfrió

a temperatura ambiente y se dejó en oscuridad durante 30 min. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 620 nm utilizando un espectrofotómetro Henos Alpha & Beta (Thermo Spectronic, UK). En forma simultánea se realizó una curva de calibración con soluciones de glucosa de concentración conocida en un rango entre 0 y 500 µg/ml y se graficó  $A_{620\text{nm}}$  vs. Concentración. Con los datos de la regresión lineal se calculó la concentración de polisacáridos en los productos fermentados.

Reactivo de Antrona: Se preparó una mezcla 66 % v/v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en agua trabajando en baño de agua-hielo debido a la naturaleza fuertemente exotérmica de la disolución. Cuando dicha solución estuvo a una temperatura aproximada de 70°C, y para facilitar su disolución, se añadió antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) en concentración final 0,5 g/l. El reactivo se almacenó a 4 °C durante no más de dos semanas.

### **6.1.3. Determinación de ácidos orgánicos en productos fermentados**

La determinación de ácidos orgánicos cualitativa y cuantitativamente se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión utilizando una columna de intercambio iónico (IE-HPLC). Para la preparación de la muestra 1 ml de producto fermentado se centrifugó durante 10 min a 14000 x g. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0,45 µm (Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA) y 20 µl del filtrado se inyectaron en el cromatógrafo. Se utilizó una columna de intercambio iónico AMINEX HPX-87H (BioRad Labs, Richmond, CA 94804, USA) y se obtuvo la absorbancia de los elutos mediante un detector UV a 214 nm (Waters <sup>TM</sup> 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA), en un tiempo de corrida de 30 min. La determinación se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min, a 60 °C, utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,009 N como fase móvil. La identificación de los ácidos se basó en la comparación de los tiempos de retención con soluciones estándar o patrones de ácidos (Tabla 1.1). El tiempo de retención de los ácidos se obtuvo a partir del cromatograma obtenido al analizar una solución acuosa de los estándares preparados con reactivos de grado HPLC (Sigma Chemical Co.).

**Tabla 1.1:** Tiempo de retención de soluciones estándar de ácidos orgánicos.

<b>Patrón</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
Ácido oxálico	5,7
Ácido cítrico	6,4
Ácido ascórbico	7,2
Ácido pirúvico	7,4
Ácido málico	7,6
Ácido succínico	9,2
Ácido láctico	10,0
Ácido fórmico	11,0
Ácido acético	12,0
Ácido propiónico	14,0
Ácido isobutírico	16,0
Ácido butírico	17,4
Ácido isovalérico	20,0

Se realizaron curvas de calibración con ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, mediante las cuales se calcularon las concentraciones de los mismos en las muestras.

#### **6.1.4. Cuantificación de polisacárido en leches fermentadas con gránulos de kefir**

Se realizó la extracción de exopolisacárido (EPS) a partir de leches fermentadas 24 y 48 horas, con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 en relación 10 % p/v. Para ello se empleó un protocolo optimizado previamente puesto a punto por miembros del grupo de investigación. Se tomaron 60 ml de leche fermentada, se centrifugaron 10000 g 15 min. Los sobrenadantes fueron trasvasados a otro recipiente y tratados con 2 volúmenes de etanol frío, colocándose estas mezclas a 4 °C por 24 h para la precipitación del polisacárido. La separación del polisacárido se realizó por centrifugación a 10000 xg a 4 °C 15 min. El precipitado obtenido fue disuelto en 6 ml de agua destilada caliente. Posteriormente se dializó esta solución con membranas con un tamaño de corte de 1000 Da (Spectra/Por® 7, Spectrum Laboratories Inc., USA), equilibradas con 2 L de agua bidestilada, durante 48 h a

4 °C. De este modo se eliminaron restos de lactosa. Finalizada esta etapa se verificó la ausencia de hidratos de carbono de bajo peso molecular por cromatografía en capa fina, y posteriormente se determinó la concentración de polisacárido por el método de Antrona descripto previamente

#### **6.1.5. Aproximación del grado de hidrólisis de proteínas lácteas**

Se realizó una aproximación del grado de hidrólisis de las proteínas lácteas durante la fermentación de la leche por gránulos de kefir, mediante determinación del nitrógeno TCA soluble y electroforesis SDS-PAGE.

##### **6.1.5.1. Determinación de nitrógeno TCA soluble**

Como aproximación del grado de hidrólisis de proteínas lácteas que se produce durante la fermentación con gránulos de kefir, se realizó una determinación de nitrógeno TCA soluble por el método de Hull (1947) modificado por Sample y col., 1984 (reactivo Folin-Ciocalteu: ácido fosfomolibdico-ácido fosfotúngstico). Para ello, se tomaron 2 ml de producto fermentado y se añadió ácido tricloroacético para obtener una concentración final del mismo del 8 % p/v. Se centrifugó 10 minutos a 7000 xg, se tomaron 0,5 ml de sobrenadante y se le añadió 1 ml de solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  15% p/v y hexametáfosfosódico 2% p/v, a los 5 min se añadieron 0,3 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) diluído (1 volumen de reactivo FC en 2 volúmenes de agua destilada). Luego de 5 min, se realizó la lectura de absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro (Metrolab 330, Argentina). Se realizó una curva de calibración con solución de L-Tirosina con concentraciones entre 0 y 20 mg/100 ml. Se compararon los valores obtenidos entre los productos fermentados y con el control de leche sin fermentar.

##### **6.1.5.2. Análisis del perfil electroforético**

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) se compararon los perfiles de proteínas de leches fermentadas con gránulos de kefir durante diferentes tiempos y de leche sin fermentar. También se analizaron las fracciones no microbianas por este método y mediante electroforesis Tricina SDS-PAGE (Schägger, 2006), con el objetivo de estudiar péptidos con baja masa molecular (1–100 kDa). La preparación de las muestras y soluciones, junto con el armado, corrida y coloración de los geles se detalla en el Apéndice.

## **7. Evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis de las leches fermentadas con gránulos de kefir**

### **7.1. Simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal**

Las leches fermentadas fueron sometidas a una digestión gastrointestinal simulada de acuerdo a protocolos previamente descritos (Roesler & Rao, 2001; Hernández-Ledesma y col., 2004), los cuales fueron adaptados y optimizados para el presente trabajo. En primer término, 40 ml de leche sin fermentar o fermentadas, fueron sometidos a una hidrólisis con 4 ml de solución (10X) de pepsina (Pepsine, from porcine gastric mucose – Sigma Aldrich, USA) en solución NaCl 125 mM; KCl 7 mM; NaHCO<sub>3</sub> 45 mM, pH 2, 37 °C, en agitación 150 rpm durante 1,5 h. Luego se llevó a pH 6 con NaOH concentrado y se agregaron 4,5 ml de solución (10X) de pancreatina 0,1 % p/v y sales biliares 0,15% p/v (Pancreatin, from porcine páncreas, Sigma-Aldrich, USA; Bile Salt, Sigma-Aldrich, USA), pH 6, 37 °C, en agitación 150 rpm durante 3 h. Finalmente se detuvo la actividad enzimática por calentamiento a 85 °C durante 10 min.

### **7.2. Análisis del perfil peptídico antes y después de la digestión simulada mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa**

Se analizó el perfil peptídico de leche sin fermentar, así como de leches fermentadas, antes y después de haber sido sometidas a la digestión simulada, mediante cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC). Se utilizó una columna C<sub>18</sub> 4,6x25 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). La elución se realizó con Solvente A: 0,1 % v/v ácido trifluoroacético en agua; Solvente B: 0,1 % v/v ácido trifluoroacético en acetonitrilo. La columna fue equilibrada con 5 % Solvente B, luego se inyectaron 20 µl de muestra y se aplicaron los siguientes protocolos: con un flujo de corrida de 0,2 ml/min, 10 min 5% Solvente B, luego un gradiente lineal 60 min 5-65% B, finalmente 20 min 5% Solvente B; o bien 10 min 5 % Solvente B, seguido de un gradiente lineal 30 min 5-95% B, finalmente 15 min 5% Solvente B, con un flujo de elución de 0,7 ml/min. La detección se realizó a 220 nm, empleando un detector UV (Waters<sup>™</sup> 996, Millipore Corporation, Milford, MA 01757, USA).

## **8. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar, para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de



Dunnet cuando se compararon todas las condiciones respecto a una condición control o Test de Tukey para comparaciones múltiples, con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

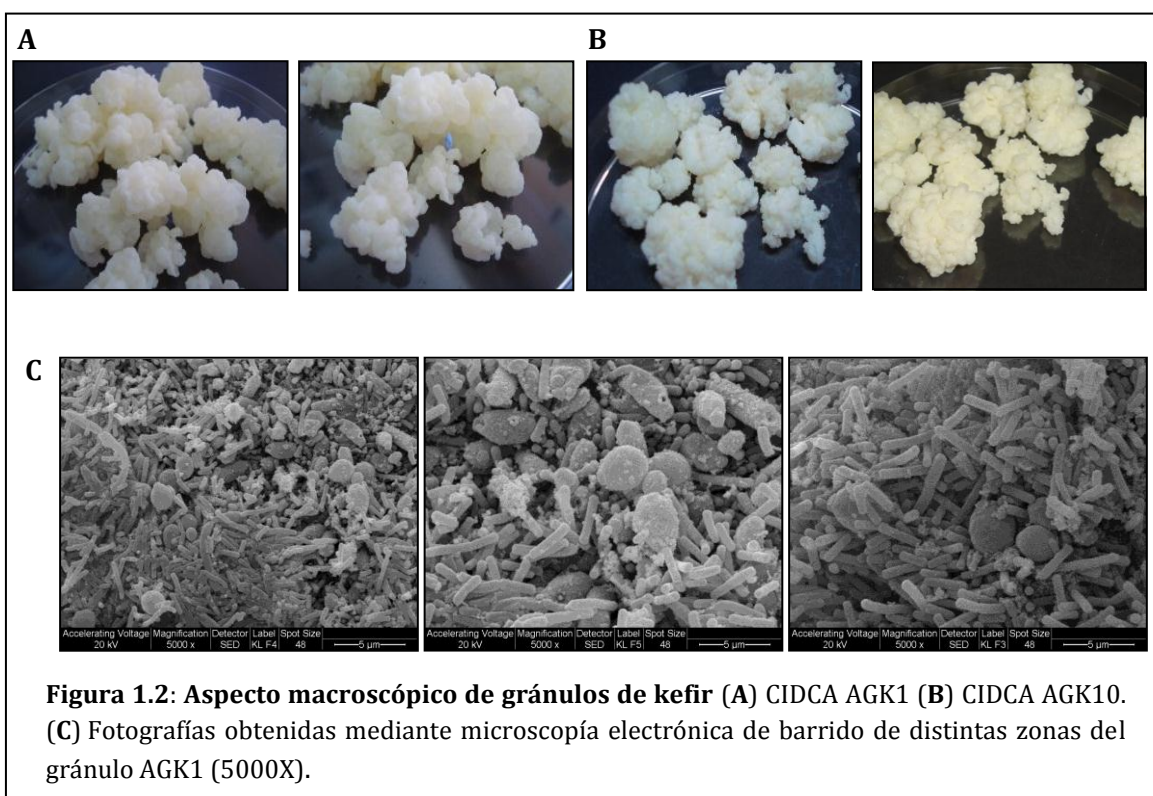
### 1. Caracterización de los gránulos de kefir y los productos fermentados

En el presente estudio se obtuvo el kefir de manera artesanal, utilizando dos gránulos con distintos orígenes pertenecientes a la colección del CIDCA: CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10, los cuales se cultivaron en leche descremada en relación 10 % p/v a 20 °C. Como paso inicial se planteó caracterizar los fermentos a utilizar y las leches fermentadas con los mismos.

#### 1.1. Gránulos de kefir

##### 1.1.1. Aspecto macroscópico y microscópico de los gránulos

El aspecto macroscópico de los gránulos utilizados en el presente trabajo se muestra en las Figuras 1.2. A y 1.2. B. Los gránulos de kefir presentan una estructura gelatinosa, son de color blanco o amarillento de aspecto similar al coliflor y su estado general se conserva a través de los sucesivos repiques. Los gránulos CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 presentaron un aspecto macroscópico similar entre sí y coincidente con las descripciones de los gránulos de kefir de distintos orígenes encontradas en literatura. La Figura 1.2. C corresponde a fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido de distintas zonas de los gránulos CIDCA AGK1, donde se observan claramente las bacterias y levaduras que los integran, coincidiendo con lo observado también en los gránulos CIDCA AGK10.



En las fotografías obtenidas por microscopía electrónica se observó la presencia de una abundante cantidad de microorganismos, predominando las bacterias con forma de bacilos de distinta longitud y tamaño. No pudo detectarse la presencia de cocos. Las levaduras se encontraron dispersas entre los bacilos en algunas zonas en mayor cantidad que en otras. Estas fotografías resultaron similares a aquellas obtenidas por Zhou y col. (2009) de la superficie externa de gránulos de kefir tibetanos crecidos en leche, las cuales muestran que la porción externa de los gránulos contiene una alta densidad de lactobacilos cortos y levaduras, mientras que la interna presenta una matriz conteniendo levaduras y bacilos de mayor longitud rectos y curvados. Muchos autores han estudiado la distribución de los microorganismos en el interior de los gránulos de kefir y los resultados son controvertidos. Un grupo apoya la hipótesis de que las levaduras se encuentran generalmente en la zona interior e intermedia del gránulo, con predominio de bacilos y menor abundancia de cocos en el área de la superficie (Bottazzi & Bianchi, 1980; Lin y col., 1999). Por el contrario, otros investigadores (Rea y col., 1996; Guzel-Seydim y col., 2005; Jianzhong y col., 2009; Magalhães y col., 2011a) describen que las levaduras se distribuyen tanto en las zonas exteriores como interiores del gránulo. Además, estos autores postulan que el material fibrilar observado puede ser el polisacárido presente en todo el gránulo. Investigadores brasileiros observaron una variación en la distribución de los microorganismos de acuerdo con el origen de los gránulos. En general, observaron bacilos, tanto en el interior como en el exterior, mientras que las levaduras fueron más frecuentes en la porción externa. Además

observaron cocos en la parte exterior sólo en uno de los gránulos estudiados (Leite y col., 2013a). Aunque se ha descrito que *Lactococcus lactis* es uno de los microorganismos predominantes de gránulos de kefir (Korsak y col., 2015), las micrografías mostradas en el presente trabajo no presentan microorganismos con morfología de cocos coincidiendo con lo reportado por otros quienes sugieren que es probablemente debido a una mala adherencia de lactococos a los gránulos que facilitaría su liberación en el proceso de lavado (Rea y col., 1996; Guzel-Seydim y col., 2005; Jianzhong y col., 2009; Magalhães y col., 2011a). Teniendo en cuenta la distribución de los microorganismos en la formación de los gránulos de kefir, es posible pensar que los microorganismos superficiales causen un mayor impacto en el proceso de fermentación de la leche (Farnworth & Mainville, 2008).

### 1.1.2. Composición microbiológica de los gránulos de kefir

Dado que se ha descrito la posible variación en la proporción de bacterias y levaduras presentes en diferentes gránulos de kefir (Garrote y col., 2010), los gránulos utilizados en este trabajo se caracterizaron en cuanto a su composición microbiológica. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 1.2 y se expresan como  $\log_{10}$  de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de gránulo.

**Tabla 1.2:** Composición microbiológica de gránulos de kefir, valores expresados como  $\log_{10}$  UFC/g.

Gránulo	BAL	LEV
<b>CIDCA AGK1</b>	8,93 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	7,14 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
<b>CIDCA AGK10</b>	8,34 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	6,97 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>

UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo de gránulo. BAL: bacterias ácido lácticas. LEV: levaduras. Los valores con distintos superíndices son presentan diferencias significativas con un nivel  $\alpha=0.05$ , comparando valores dentro de cada columna.

Entre los gránulos de kefir estudiados no se observaron diferencias significativas en su composición microbiológica. En ambos se encontró un contenido de bacterias ácido lácticas del orden de  $10^8$  UFC/g y de levaduras del orden de  $10^7$  UFC/g coincidente con los resultados hallados previamente en los gránulos CIDCA AGK1, AGK2, AGK3 y AGK4 para las bacterias y en CIDCA AGK1, AGK2 y AGK4 para las levaduras, mientras que el gránulo AGK3 presentó una concentración de levaduras un orden de magnitud mayor a la de los demás gránulos (Garrote y col., 2001). Garofalo y col. (2015) analizaron la composición microbiológica de gránulos con orígenes en diferentes zonas de Italia encontrando una

concentración de bacterias lácticas de entre  $10^7$  y  $10^9$  UFC/g y levaduras en el orden de  $10^7$  UFC/g. da Cruz Pedrozo Miguel y col. (2010) estudiaron gránulos de kefir con origen en diferentes zonas de Brasil y EEUU, hallando una mayor concentración de bacterias lácticas viables en los gránulos de EEUU que alcanzó  $10^{10}$  UFC/g, mientras que en las demás muestras analizadas se encontraron concentraciones de entre  $10^5$  y  $10^9$  UFC/g.

Los gránulos de kefir están compuestos por bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas, levaduras fermentadoras y no fermentadoras de lactosa y bacterias ácido acéticas (Garrote y col., 2001). La microbiota de los gránulos es variable y depende del origen de los gránulos, de las condiciones locales de cultivo, del método de elaboración y de almacenamiento del kefir (Dobson y col., 2011; Altay y col., 2013; Marsh y col., 2013).

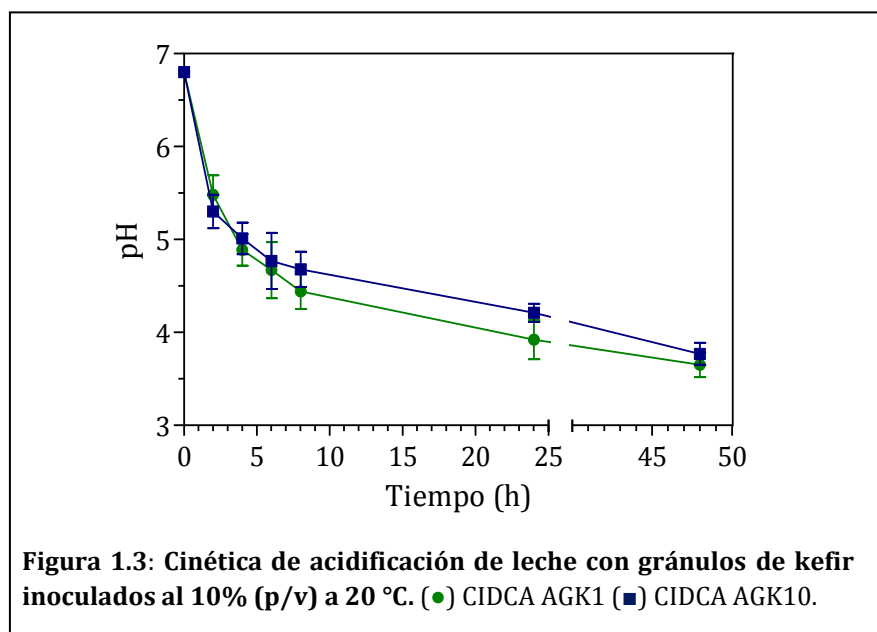
La microbiota de los gránulos de kefir utilizados en este estudio fue analizada mediante métodos dependientes e independientes de cultivo. Hamet y col. (2013) por electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE) evidenció que los gránulos AGK1 y AGK10 presentaban perfiles con alto porcentaje de similitud. Además en estos gránulos se ha identificado la presencia de *L. kefiranofaciens*, *L. parakefiri*, *L. kefiri*, *Lc. lactis*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Ln. mesenteroides*, bacterias del género *Acetobacter*, *S. unisporus*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *I. occidentalis* (Garrote y col., 2010; Londero y col., 2012; Hamet y col., 2013; Diosma y col., 2014).

Las variaciones en el equilibrio dinámico de la microbiota de los gránulos de kefir son responsables de los cambios en las propiedades fisicoquímicas, reológicas, sensoriales y nutricionales del kefir.

### 1.1.3. Cinética de acidificación y aumento de biomasa

El crecimiento simbiótico de la microflora que ocurre a 20 °C tanto en el gránulo como en la leche, produce por un lado, el aumento del número de microorganismos y por otro, el aumento de la masa de los gránulos. Se determinó la tasa de crecimiento de los gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10, definida como aumento de peso por gramo de gránulo por subcultivo. Se observó que la tasa de crecimiento no fue significativamente diferente ( $p>0,05$ ) entre gránulos, con valores de  $0,14 \pm 0,06$  g/g y  $0,13 \pm 0,03$  g/g respectivamente. Los gránulos duplicaron su peso en aproximadamente 5 subcultivos. Asimismo no se observaron diferencias en el aspecto macroscópico de los gránulos luego de 20 subcultivos sucesivos. El hecho de que la apariencia de los gránulos no se altere brinda información acerca de su estado fisiológico, el aumento de peso indica que la microbiota presente en los gránulos está activa y que el balance de microorganismos es adecuado siendo esto necesario para la síntesis de los componentes de la matriz que los inmovilizan (Garrote y col., 2010).

Los gránulos de kefir crecieron en leche produciendo un marcado descenso del pH durante las primeras 8 horas de incubación (Figura 1.3). Las leches fermentadas con gránulos AGK1 y AGK10 alcanzaron un pH de 3,9 y 4,2 en 24 h y de 3,65 y 3,77 luego de 48 h respectivamente.



Irigoyen y col. (2003) estudiaron el efecto de parámetros como la concentración de gránulos, la agitación y la temperatura en la acidificación del producto, demostrando que los factores estudiados tienen influencia significativamente en la evolución del pH durante la fermentación. La velocidad de acidificación aumentó con la cantidad de gránulo. La temperatura de fermentación también afectó tanto, la velocidad de acidificación como la acidez finalmente alcanzada. Estos son parámetros tecnológicos que pueden ser modificados en función de las características deseadas para el producto final. Por su parte Garrote y col. (2001) demostraron que cuando los gránulos de kefir son inoculados en leche al 1 % p/v la velocidad de acidificación es lenta, alcanzándose un pH 4 en 72 h; mientras que cuando se inoculan al 10 % p/v se alcanza un pH 4 en 6-8 h, estando la velocidad de acidificación estrechamente relacionada con la relación gránulo/leche utilizada.

## 1.2. Leches fermentadas con gránulos de kefir

### 1.2.1. Composición microbiológica de los productos fermentados

Cuando los gránulos son inoculados en la leche parte de los microorganismos se desprenden, pasan a ella y también crecen. Se analizó la composición microbiológica de las leches fermentadas con los diferentes gránulos encontrándose en ambos productos una concentración de bacterias lácticas de  $1,4\text{-}2,2 \times 10^8$  UFC/ml y de levaduras de  $2,2\text{-}5,8 \times 10^6$  UFC/ml (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3:** Composición microbiológica de leches fermentadas 24 h con gránulos de kefir sembrados al 10 % (p/v), expresados como  $\log_{10}$  UFC/ml.

Gránulo	BAL	LEV
<b>CIDCA AGK1</b>	$8,31 \pm 0,24^a$	$6,73 \pm 0,22^a$
<b>CIDCA AGK10</b>	$8,09 \pm 0,28^a$	$6,27 \pm 0,31^a$

UFC/ml: unidades formadoras de colonia por ml de leche fermentada. BAL: bacterias ácido lácticas. LEV: levaduras. Los valores con distintos superíndices presentan diferencias significativas con un nivel  $\alpha=0,05$ , comparando valores dentro de cada columna.

Witthuhn y col. (2005) reportaron que los niveles de bacterias lácticas y levaduras presentes en el kefir son muy variables y van desde  $6,4 \times 10^4$  a  $8,5 \times 10^8$  y de  $1,5 \times 10^5$  a  $3,7 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente. Irigoyen y col. (2005) informaron que, además de una población viable de  $10^8$  UFC/ml de lactobacilos y lactococos y  $10^5$  UFC/ml de levaduras, el kefir también contenía bacterias ácido acéticas en el orden de  $10^6$  UFC/ml después de 24 h de fermentación. Magalhães y col. (2011a) informaron un contenido de bacterias lácticas de hasta  $10^{12}$  UFC/ml y de levaduras de  $10^8$  UFC/ml luego de 24 h de fermentación. Además cuantificaron el contenido de bacterias ácido acéticas, reportando una concentración de entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC/ml pertenecientes al género *Acetobacter*. Las cantidades de levadura en el kefir son variables, con valores que oscilan desde  $10^3$  a  $10^6$  UFC/ml (Simova y col., 2002; Farnworth, 2005; Guzel-Seydim y col., 2005; Irigoyen y col., 2005; Grønnevik y col., 2011). En general, las bacterias ácido lácticas son más numerosas que las levaduras y las bacterias ácido acéticas en los gránulos de kefir de leche, sin embargo las condiciones de fermentación pueden afectar este patrón de distribución de microorganismos en los productos fermentados (Magalhães y col., 2011a) como también a las características fisicoquímicas de los mismos. Londero y col. (2012) analizaron la composición microbiológica de leche fermentada con gránulos AGK10 mediante métodos independientes de cultivo, identificando la presencia de *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri*, *L. parakefiri* y *Lc. lactis*.

Con respecto a las levaduras, detectaron la presencia de *S. unisporus*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y *K. exigua* o *K. turicensis*.

## 1.2.2. Composición química de la leche fermentada con gránulos de kefir

### 1.2.2.1. Determinación del contenido de azúcares totales

Dado que el contenido de lactosa es el macrocomponente que presenta mayor variación durante la fermentación de de leche en la obtención de kefir, se cuantificó el contenido de azúcares totales, en leches fermentadas con gránulos de kefir durante 24 y 48 h a 20 °C y en leche sin fermentar, mediante el método de Antrona (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4:** Concentración de azúcares totales (g/100 ml) en leches fermentadas con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 inoculados al 10 % (p/v) durante 24 y 48 h.

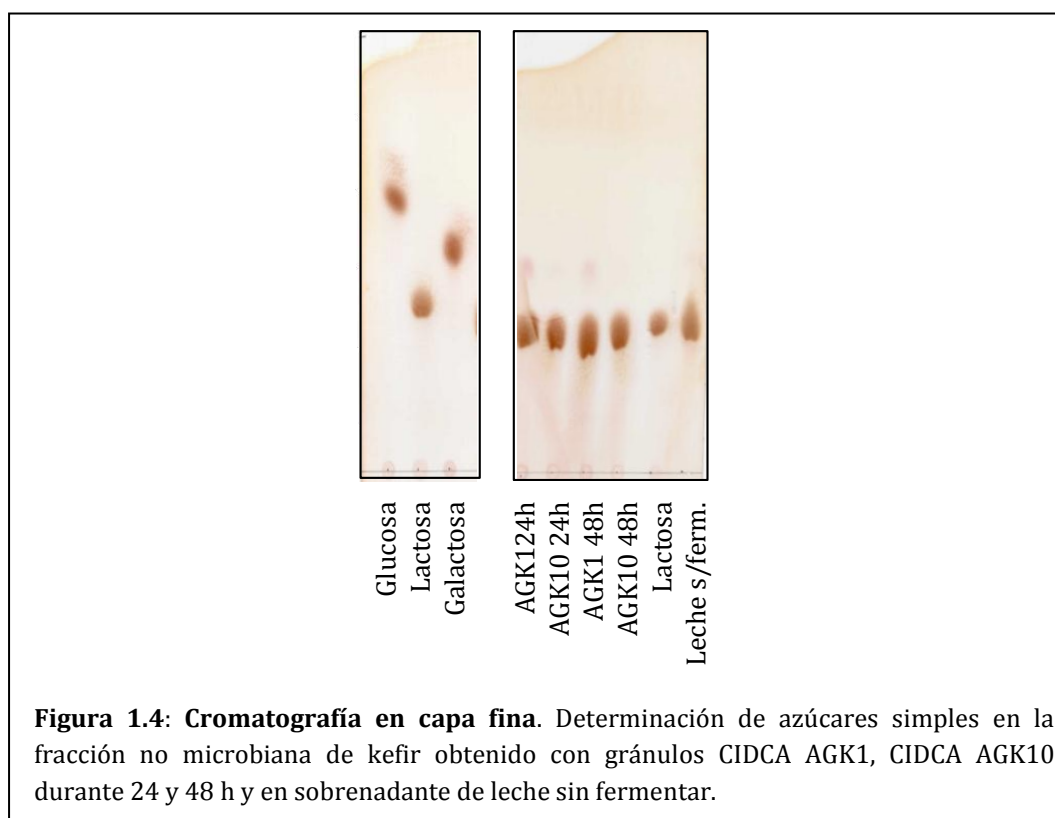
	Azúcares totales (g/100ml)	
	24 h	48 h
Leche fermentada gránulos AGK1	3,73 ±0,17 <sup>b</sup>	3,59 ±0,25 <sup>b</sup>
Leche fermentada gránulos AGK10	3,90 ±0,21 <sup>b</sup>	3,56 ±0,20 <sup>b</sup>
Leche sin fermentar	4,62 ±0,20 <sup>a</sup>	

Los diferentes superíndices indican valores significativamente diferentes del control de leche sin fermentar con nivel  $\alpha=0,05$ .

El contenido de azúcares totales en leche sin fermentar fue de 4,62 %, mientras que las leches fermentadas con gránulos AGK1 y AGK10 durante 24 h presentaron una disminución del contenido de azúcares totales, con valores de 3,7 y 3,9 % respectivamente, y luego de 48 h el contenido de azúcares totales fue menor, con valores de 3,5 %.

Se analizaron los azúcares simples presentes en la fracción no microbiana de kefir mediante cromatografía en capa fina y se calcularon los valores de R<sub>f</sub> para cada muestra, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo (Figura 1.4 y Tabla 1.5).





**Tabla 1.5:** Valores de Rf calculados para patrones y muestras analizadas mediante TLC.

Muestra	Rf
Glucosa	0,58
Lactosa	0,34
Galactosa	0,50
AGK1 24h	0,34 / 0,50
AGK1 48h	0,34 / 0,50
AGK10 24h	0,34 / 0,50
AGK10 48h	0,34

En las muestras de fracción no microbiana de kefir obtenido con gránulos CIDCA AGK1 tanto a las 24 como a las 48 h se observó una mancha intensa con un valor de Rf equivalente al del patrón de lactosa y otra mancha de menor intensidad con Rf coincidente con el de galactosa. La fracción no microbiana de kefir obtenida con gránulos CIDCA AGK10 presentó a las 24 h 2 manchas coincidentes con lactosa y galactosa, mientras que a las 48 h sólo se detectó la mancha coincidente con el patrón de lactosa (Figura 1.4). También se analizó de la misma manera el sobrenadante de leche sin fermentar, el cual presentó una única mancha con Rf equivalente al patrón de lactosa. La presencia de galactosa en las muestras podría provenir

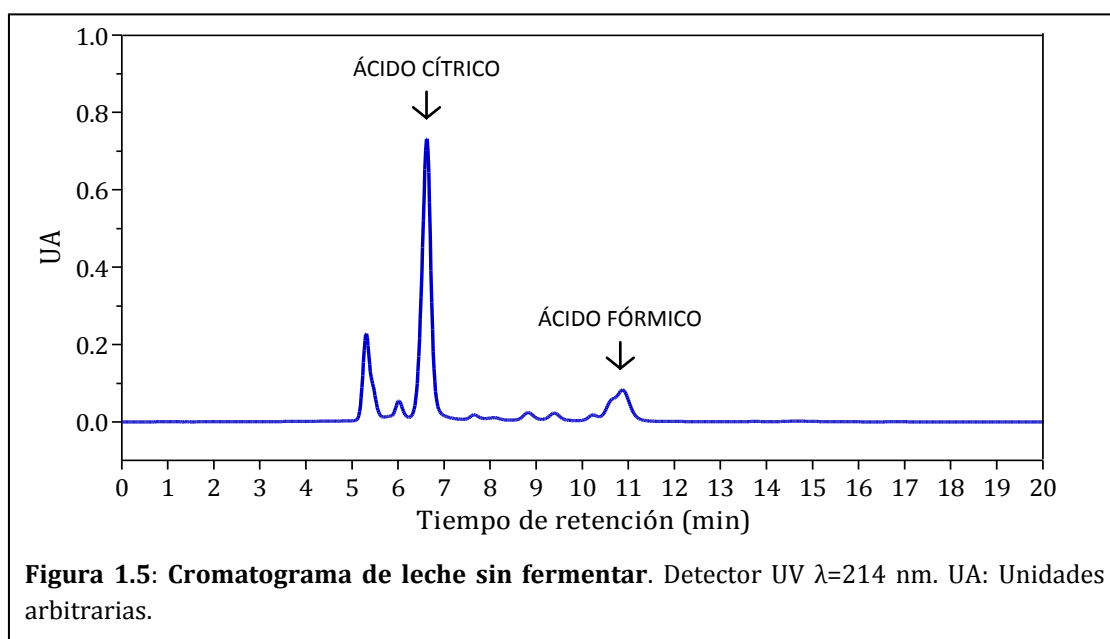
de la hidrólisis de la lactosa por los microorganismos. La menor intensidad en la concentración de galactosa y el hecho de que no se detecte glucosa es un indicio de que estos azúcares están siendo consumidos por las bacterias y las levaduras del gránulo de kefir como fuente de carbono o también pueden emplearlos en la formación de polisacárido (kefiran) para la generación de biomasa durante el proceso de fermentación (Alm, 1982; Irigoyen y col., 2005). Las diferencias observadas entre los gránulos a las 48 h podría deberse a que están compuestos por diferentes poblaciones microbianas.

De acuerdo a los resultados el principal azúcar presente en leche fermentada corresponde a lactosa. El contenido de lactosa remanente luego de 24 h de fermentación con gránulos AGK1 y AGK10, corresponde a un 80,8 % y 85,6% respectivamente, del contenido en la leche sin fermentar. Luego de 48 h estos valores descienden a un 75,6 % y 76,9 %. Assadi y col. (2000) elaboraron kefir en leche inoculando los gránulos en relación 5% p/v y reportaron que luego de 24 h de fermentación a 25 °C se consumió un 1,4 % de lactosa, lo cual refleja un valor inferior al obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, de manera similar a lo encontrado en el presente trabajo, García Fontán y col. (2006) hallaron que el contenido de lactosa en leche bovina fermentada con cultivos iniciadores de kefir comerciales se redujo de 4,92 % a 4,02 % luego de 24 h de fermentación, lo que equivale a un 81 % de lactosa remanente. Por otro lado, Irigoyen y col. (2005) describieron los mismos valores de consumo de lactosa que los obtenidos en este estudio, luego de 24 h de fermentación a 25 °C inoculando los gránulos en leche en relación 5 % p/v. También reportaron que el porcentaje de gránulos de kefir utilizado como inóculo influyó en el contenido de lactosa del producto obteniéndose un nivel superior de azúcar remanente con el menor porcentaje de inóculo. Similar a los valores encontrados en kefir, Cheng (2010) informó que en otra leche fermentada como lo es un yogur comercial, se degrada un 20 % de la lactosa original.

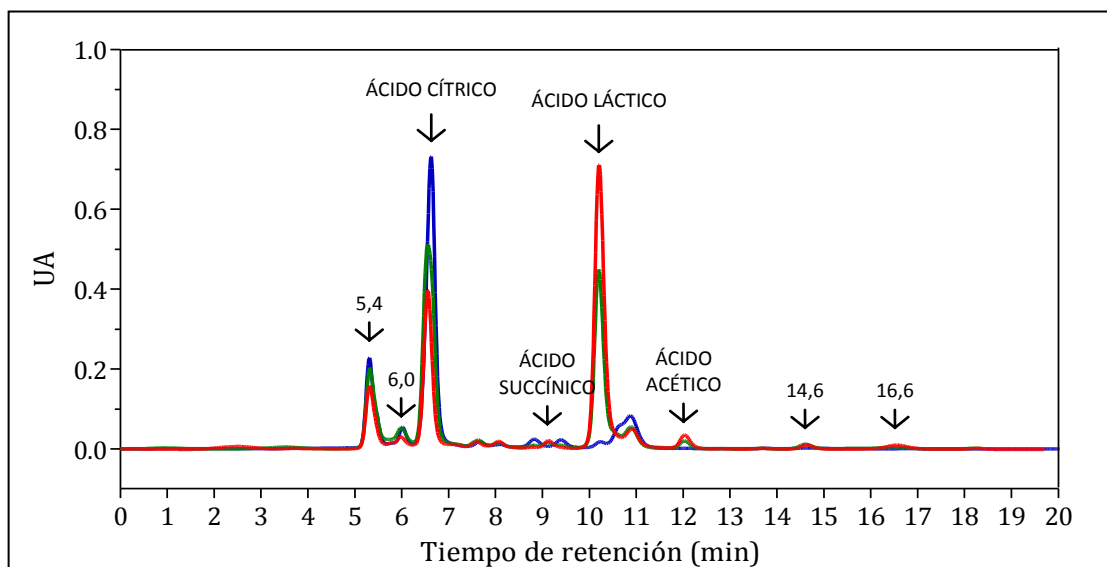
#### **1.2.2.2. Cuantificación de ácidos orgánicos**

El consumo de lactosa produce un descenso de pH que está asociado a la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación. Ésta es una característica importante, debido a que los ácidos orgánicos están vinculados con las propiedades organolépticas e inhibitorias de los productos fermentados. El análisis de los ácidos orgánicos en las leches fermentadas se realizó por cromatografía líquida de alta presión (*High Pressure Liquid Chromatography*, HPLC) utilizando una columna de intercambio iónico, empleando ácidos orgánicos de grado analítico como patrones para la identificación.

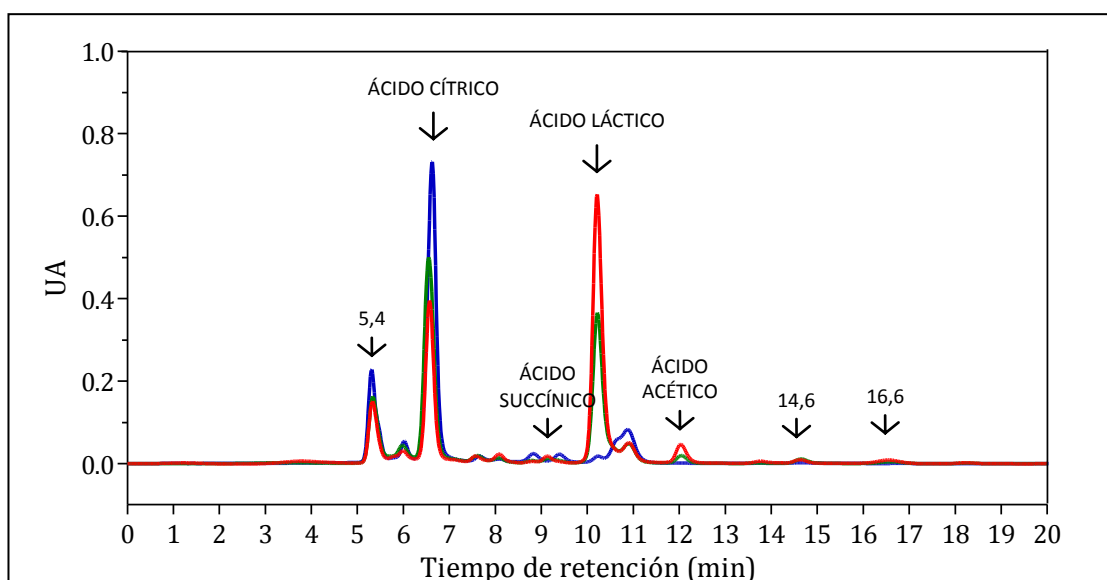
El cromatograma de leche sin fermentar presentó 4 picos con tiempos de retención 5,4; 6,0; 6,5 y 10,9 min (Figura 1.5). El pico a tiempo 6,5 min coincidió con el del patrón de citrato, este compuesto está presente en altas concentración en la leche estabilizando las micelas de caseína. El pico a los 11,0 min podría coincidir con el de ácido fórmico; mientras que los picos a 5,4; 6,5 no coincidieron con el tiempo de retención de ninguno de los ácidos orgánicos incluidos como referencia: oxálico (5,7 min), ascórbico (7,2 min), pirúvico (7,4 min), málico (7,6 min), succínico (9,2 min), láctico (10 min), acético (12 min), propiónico (14 min), isobutírico (16), butírico (17,4 min) e isovalérico (20 min). Asimismo se observaron picos menores que no fueron identificados.



Al fermentar leche con gránulos de kefir al 10 % p/v durante 24 y 48 h, se observó un aumento de las áreas bajo los picos con tiempos de retención equivalentes a los ácidos succínico (9,2 min), láctico (10 min), acético (12 min), mientras que el área del pico con tiempo de retención correspondiente al de ácido cítrico (6,5 min) disminuyó en el producto fermentado en función del tiempo, respecto a la leche sin fermentar (Figuras 1.6 y 1.7). Asimismo se observó un aumento del área de picos con tiempos de retención 6,0; 14,6; 16,6 min que no pudieron ser identificados. Estos resultados se observaron en leches fermentadas tanto con los gránulos CIDCA AGK1 como CIDCA AGK10.



**Figura 1.6: Perfil de ácidos orgánicos.** Cromatogramas correspondientes a: (●) Leche sin fermentar (●) Leche fermentada con gránulos de kefir CIDCA AGK1 inoculados al 10 % p/v durante 24 h a 20 °C y (●) durante 48 h. Detector UV  $\lambda=214$  nm. UA: Unidades arbitrarias.



**Figura 1.7: Perfil de ácidos orgánicos.** Cromatogramas correspondientes a: (●) Leche sin fermentar (●) Leche fermentada con gránulos de kefir CIDCA AGK10 inoculados al 10 % p/v durante 24 h a 20 °C y (●) durante 48 h. Detector UV  $\lambda=214$  nm. UA: Unidades arbitrarias.

A partir de los cromatogramas se determinaron las concentraciones de ácido láctico y acético en las leches fermentadas. Las mismas fueron calculadas mediante curvas de calibración construidas con soluciones de ácidos de concentración conocida. La concentración de ácido láctico, ácido acético y el pH de leches fermentadas inoculadas al 10 % p/v con gránulos de kefir CIDCA AKG1 y CIDCA AGK10 durante 24 y 48 h a 20 °C se detalla en la Tabla 1.6.

**Tabla 1.6:** pH y concentración de ácido láctico y acético en leches fermentadas con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y AGK10 inoculados al 10 % (p/v) a 20 °C durante 24 y 48 h.

	Tiempo (h)	pH	Ác. Láctico (mM)	Ác. Láctico (% p/v)	Ác. Acético (mM)	Ác. Acético (% p/v)
<b>CIDCA</b>	24	3,90 ±0,09	92,5 ±6,3 <sup>a</sup>	0,83	4,3 ±5,5 <sup>a</sup>	0,03
<b>AGK1</b>	48	3,65 ±0,12	147,7 ±15,3 <sup>a</sup>	1,32	9,8 ±2,2 <sup>a</sup>	0,06
<b>CIDCA</b>	24	4,21 ±0,10	86,2 ±9,1 <sup>a</sup>	0,77	4,6 ±2,7 <sup>a</sup>	0,03
<b>AGK10</b>	48	3,70 ±0,15	125,4 ±8,4 <sup>a</sup>	1,12	11,3 ±5,9 <sup>a</sup>	0,06

Los valores con distintos superíndices presentan diferencias significativas con un nivel  $\alpha=0,05$ , comparando valores dentro de cada columna. ANOVA seguido de Test de Tukey.

Como se mencionó anteriormente, el kefir contiene bacterias ácido lácticas tanto homo- como hetero-fermentativas, lo que explica la producción de ácido láctico y acético durante la fermentación de la leche. Las bacterias lácticas fermentan azúcares principalmente mediante dos rutas. La vía de Embden-Meyerhof-Parnas que conduce casi exclusivamente a la producción de ácido láctico, conociéndose como fermentación homoláctica. Por otro lado pueden utilizar la vía de las pentosas fosfato que conduce a la generación de cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato y CO<sub>2</sub>, además de ácido láctico y es conocida como fermentación heteroláctica (Axelsson, 2004). Si bien estas vías son las más frecuentes, diferentes condiciones de crecimiento pueden afectar significativamente los productos finales formados por las bacterias lácticas fundamentalmente debido al desvío del piruvato hacia rutas metabólicas alternativas y/o al uso de aceptores externos de electrones.

La presencia de citrato en la leche puede incidir en la formación de productos metabólicos distintos a los ácidos láctico y acético durante la fermentación. El citrato puede ser metabolizado por algunas bacterias lácticas, con la consecuente producción de diacetilo, acetoína, formiato, acetato o succinato, dependiendo de la bacteria y las condiciones de crecimiento (Axelsson, 2004). Su metabolismo se ha estudiado en mayor detalle para *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc* sp. y *Weissella* sp. que son empleadas para la síntesis de compuestos aromáticos en la industria láctea (García Quintans y col., 2008). Sin embargo también se ha descrito en especies del género *Lactobacillus* tales como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. viridescens*, *L. paracasei*, *L. zeae* y *L. rhamnosus* (Skeie y col., 2008), algunas de ellas presentes en estos gránulos de kefir (Garrote y col., 2001; Londero y col., 2012). La disminución de citrato durante la fermentación que se observa en los cromatogramas acompañada del aumento de un pico con tiempo de retención equivalente al succinato podría indicar que algunos de los microorganismos presentes en el kefir lo

utilizarían, contribuyendo a las características organolépticas típicas de este producto (Rattray & O'Connel, 2011).

García Fontán y col. (2006) estudiaron la producción de ácidos orgánicos en leche bovina utilizando cultivos iniciadores de kefir comerciales. Ellos encontraron que el valor de L(+)-ácido láctico aumentó de 0,01 % a 0,76 % y el pH fue de 4,24 con una fermentación de 24 h. En otro estudio, Magalhaes y col. (2011a) mostraron que el contenido de ácido láctico en el kefir preparado con una relación 10 % gránulo/leche alcanzó hasta 1,74 % y la de ácido acético 0,27 %. Las concentraciones de ácido láctico y acético informadas por Garrote y col. (2010) en leches fermentadas con gránulos de kefir de distintos orígenes fueron de entre 1,30-2,30 % y 0,13-0,29 % p/v respectivamente. Por otro lado, Lontero y col. (2011) informaron que, durante la fermentación de diferentes sueros de quesería con gránulos de kefir CIDCA AGK10 al 10 % p/v, la concentración de ácido láctico alcanza valores de entre 0,84 y 1,20 % p/v. Leite y col. (2013b) analizaron leche fermentada con gránulos de kefir de origen brasileiro en relación 3 % p/v e informaron una concentración de ácido láctico y acético de 0,74 y 0,09 %. En su estudio no detectaron ácido succínico, ni fórmico. Guzel-Seydim y col. (2000) analizaron la producción de ácidos orgánicos y compuestos volátiles en kefir preparado en leche al 0,625 % p/v. Ellos obtuvieron una concentración de ácido láctico de 0,6 % en 24 h de fermentación a 25 °C, mientras que no detectaron ácido acético, propiónico ni butírico. También observaron una disminución en la concentración de citrato durante la fermentación. Estas diferencias en las concentraciones de ácidos orgánicos y metabolitos detectadas por los diferentes estudios podrían atribuirse fundamentalmente a variaciones en la microflora de los diferentes gránulos y a las distintas condiciones de elaboración de kefir.

### 1.2.2.3. Cuantificación de exopolisacáridos en leches fermentadas

La producción de exopolisacáridos (EPS) es una característica importante que poseen ciertas especies de microorganismos. La producción *in situ* de EPS contribuye a las propiedades reológicas y a la textura del producto que se obtiene (Frengova y col., 2002). El polisacárido producido por los microorganismos inmersos en los gránulos de kefir, se conoce comúnmente como “kefiran” según lo propuesto por La Rivière y col. (1967). El mismo podría contribuir a los efectos beneficiosos para la salud del consumidor atribuidos al kefir (Medrano y col., 2008, 2011; Chen y col., 2012).

El kefirán se disuelve lentamente en agua fría, de forma rápida en agua caliente y precipita en dos volúmenes de etanol frío. Estas propiedades se utilizaron para su aislamiento y purificación a partir de las leches fermentadas tal como se describió en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo.

La concentración de polisacárido obtenida en leches fermentadas con gránulos de kefir fue de aproximadamente 200 mg/L, (Tabla 1.7). No se observaron diferencias significativas entre los tiempos de fermentación analizados ni entre los gránulos.

**Tabla 1.7:** Concentración de EPS (mg/l) en leches fermentadas con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 inoculados al 10 % (p/v) durante 24 y 48 h.

	EPS (mg/l)	
	24 h	48 h
Leche fermentada gránulos AGK1	212,92 ±39,02 <sup>a</sup>	216,90 ±31,79 <sup>a</sup>
Leche fermentada gránulos AGK10	234,10 ±40,87 <sup>a</sup>	219,76 ±24,08 <sup>a</sup>

Los diferentes superíndices indican valores significativamente diferentes con un nivel  $\alpha=0.05$ .

Rimada y Abraham, (2001 y 2003) estudiaron la producción de exopolisacárido en kefir, observaron que el polisacárido sintetizado por microorganismos del kefir, se exporta a los medios de cultivo alcanzando valores de 250 y 218 mg/l de kefirán en suero de leche y leche, respectivamente. Se cree que *L. kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* es el principal productor del kefirán que compone los gránulos de kefir y que además, la producción de este polisacárido se estimula cuando dicho microorganismo crece en co-cultivo con *S. cerevisiae* (Cheirsilp y col., 2003).

#### 1.2.2.4. Determinación del grado de proteólisis

La leche contiene sólo pequeñas cantidades de aminoácidos y péptidos cortos, por lo que las bacterias lácticas dependen de su sistema proteolítico para obtener los aminoácidos esenciales a partir de caseínas durante el crecimiento en la leche (Hébert y col., 2008; Lamarque y col., 2011). Este sistema proteolítico no sólo es esencial para el crecimiento bacteriano, sino que también contribuye al desarrollo de sabor y textura de los productos fermentados y puede promover la salud humana a través de la liberación de péptidos bioactivos durante la fermentación de la leche (Hébert y col., 2008, 2010; Savijoki y col., 2006). Las proteínas lácteas son una fuente importante de péptidos bioactivos (Clare &

Swaisgood, 2000; Silva & Malcata, 2005; Fitzgerald & Murray, 2006; Korhonen & Pihlanto, 2006; Szwajkowska y col., 2011). De hecho, varios péptidos con actividad inmunomoduladora, antimicrobiana, opioide y antihipertensiva se han aislado de productos lácteos fermentados (Fitzgerald & Murray, 2006; Hayes y col., 2007).

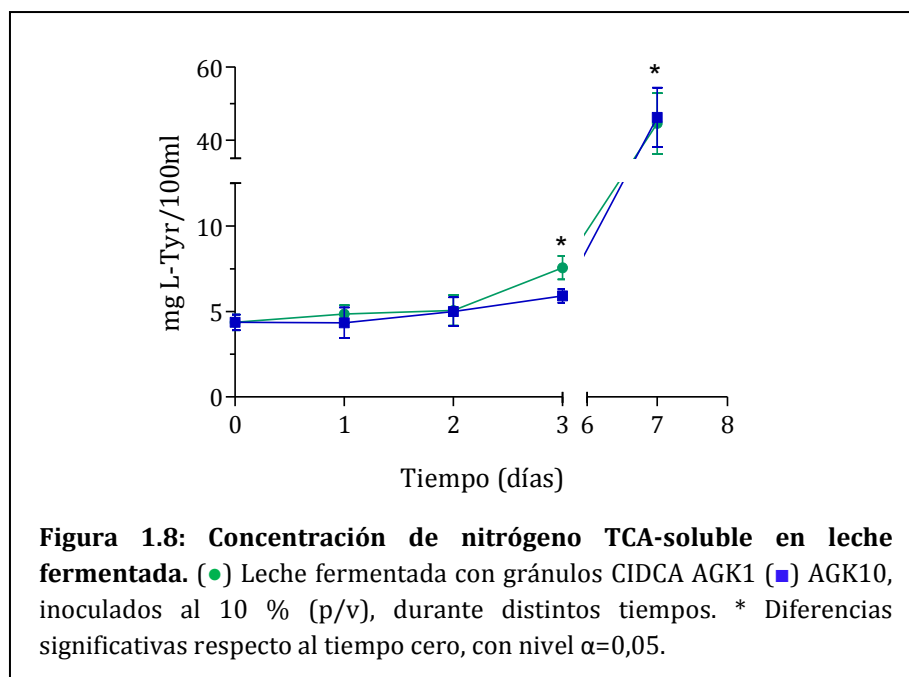
Hasta el momento, pocos trabajos científicos han focalizado sus estudios en la actividad proteolítica del consorcio microbiano que forma los gránulos de kefir, ya que en general lo han hecho abordando la temática utilizando cepas aisladas o cultivos mixtos de cepas conocidas. A fin de caracterizar la actividad proteolítica de los microorganismos presentes en los gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 se emplearon técnicas que brindan información complementaria: se evaluó la aparición de productos de hidrólisis mediante la cuantificación de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA), se analizó la proteólisis por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE) y se caracterizaron los fragmentos peptídicos obtenidos luego de la fermentación mediante HPLC de fase reversa.

#### **1.2.2.4.1. Evaluación de la aparición de productos de hidrólisis mediante la cuantificación de nitrógeno TCA soluble**

El nivel de nitrógeno TCA soluble de las leches fermentadas con gránulos de kefir durante 24, 48 y 72 h, y luego de 7 días de fermentación se midió por el método de Hull (1947) modificado por Samples y col. (1984). Este método cuantifica el aumento de aminoácidos aromáticos en la fracción TCA soluble expresados como L-tirosina (L-Tyr). Para ello se separaron los péptidos pequeños y los aminoácidos de las proteínas y componentes de mayor tamaño molecular mediante el agregado de TCA al 8 %, luego se centrifugó y se agregó el reactivo de Folin-Ciocalteu al sobrenadante, desarrollando color azul debido a la reducción del fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo, por los aminoácidos aromáticos. La intensidad de color se mide espectrofotométricamente y se convierten a su equivalente en mg L-Tyr/100 ml utilizando una curva estándar.

En la Figura 1.8 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de productos de hidrólisis de proteínas expresados como su equivalente en mg L-Tyr/100 ml en función del tiempo de fermentación.



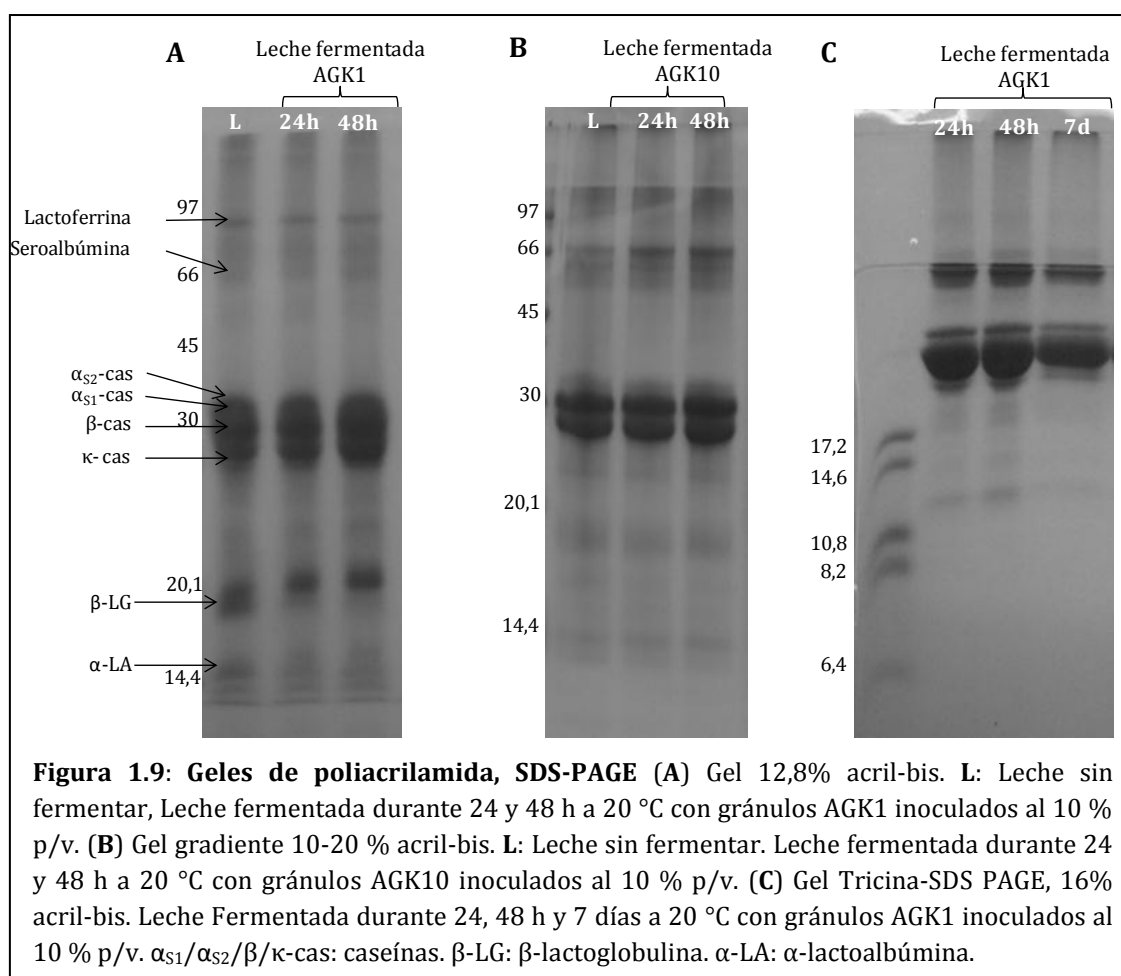


Como se observa en la Figura 1.8 los gránulos de kefir no producen un aumento significativo en la concentración de nitrógeno TCA soluble en los tiempos de fermentación correspondientes a su consumo en su forma tradicional, en tanto que sí lo hace luego de 72 h de fermentación. Al cabo de 7 días de fermentación a 20 °C se observó un aumento significativo de nitrógeno TCA soluble respecto a la leche sin fermentar, aunque en estas condiciones el producto obtenido presentó aspecto y aroma desagradable. Los resultados obtenidos indicarían que los gránulos CIDCA AGK1 y AGK10 poseen baja actividad proteolítica.

En relación al contenido de aminoácidos libres generados durante la fermentación, Irigoyen y col. (2012) reportaron que el contenido de los mismos en kefir obtenido por inoculación de gránulos en leche al 5 % p/v durante 24 h a 25 °C resultó menor al encontrado en muestras de yogures comerciales. El kefir contiene un mayor número y variedad de microorganismos, que podrían consumirlos y contribuir a las diferencias observadas entre los diferentes productos. Además evidenciaron diferencias en los perfiles de aminoácidos libres detectados en los distintos productos. Sin embargo, Simova y col. (2006) describieron que la concentración de aminoácidos libres obtenida con una mezcla de cepas aisladas de kefir resultó mayor a la obtenida en un yogur comercial y que la producción de aminoácidos está relacionada con el crecimiento y la acidificación del medio.

#### 1.2.2.4.2. Evaluación de la proteólisis por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE)

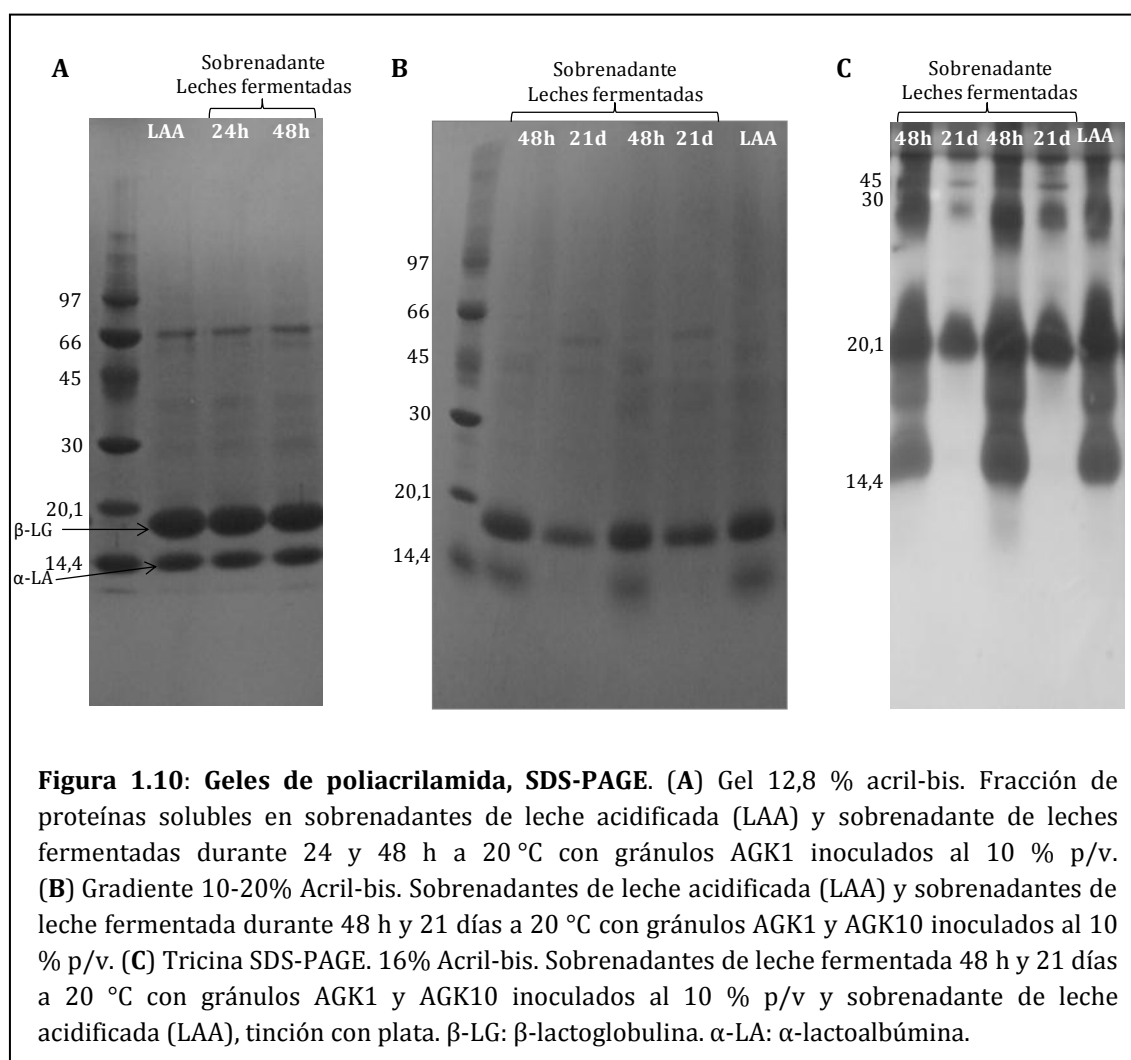
Se analizaron los perfiles proteicos de leche descremada comercial sin fermentar y leches fermentadas con gránulos de kefir durante distintos tiempos mediante electroforesis SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE. Los geles obtenidos se presentan en la Figura 1.10. Para la corrida se utilizó tanto un *buffer* Tris-Glicina o bien la condición con *buffer* Tris-Tricina que permite la mejor resolución de péptidos de bajos pesos moleculares.



En la Figura 1.9 A, en la primer calle se visualizaron las bandas correspondientes a diferentes fracciones proteicas mayoritarias de la leche sin fermentar como son la lactoferrina (80 kDa), seroalbúmina (67 kDa), cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgGP), caseínas (26-32 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa),  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa). Luego de la fermentación con gránulos de kefir AGK1 y AGK10 durante 24 y 48 h, no se observaron diferencias significativas en los perfiles electroforéticos respecto a la leche control sin fermentar (Figura 1.9 A y B). La Figura 1.9. C, presenta una fotografía del gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE donde se analizó la leche fermentada con gránulos AGK1

durante distintos tiempos de fermentación. Se observó que los perfiles obtenidos con 24 y 48 h de fermentación no difieren entre sí significativamente. A los 7 días se evidenció la proteólisis de las bandas correspondiente a las  $\alpha$ -  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas. Además se detectó una disminución en la intensidad de las bandas de pesos moleculares inferiores correspondiente a  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina. Sin embargo, por esta metodología no se visualizó la aparición de bandas de menor peso molecular.

Por otro lado se analizaron en forma comparativa las fracciones que quedan después de la separación de las caseínas por centrifugación de leche fermentada con gránulos AGK1 y AGK10 durante 24 y 48 h o 21 días y de leche acidificada con ácido láctico y ácido acético hasta pH 3,8 (Figura 1.10).



En estos geles se observaron las bandas características de las proteínas del suero de leche, las cuales no precipitan a pH ácido y se mantienen solubles en el sobrenadante luego de la fermentación. Como se observa en la Figura 1.10 A, no se detectaron diferencias

significativas entre el perfil proteico del sobrenadante de leche artificialmente acidificada y fermentada con gránulos de kefir durante 24 y 48 h. En la Figura 1.10 B se observó que si la fermentación se prolonga durante 21 días se produce la desaparición total de la banda de peso molecular 14,4 kDa, correspondiente a la  $\alpha$ -lactoalbúmina. En la Figura 1.10 C se analizaron las mismas fracciones en un gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE y se confirmaron los resultados dado que a las 48 h no se evidenciaron cambios significativos entre los perfiles de leche fermentada y leche acidificada, mientras que se observó la completa desaparición de la banda 14,4 kDa correspondiente a  $\alpha$ -lactoalbúmina luego de 21 días de fermentación; sin embargo tampoco se detectó en este gel, la aparición de péptidos con menores pesos moleculares posiblemente debido a que el método empleado no posee la sensibilidad suficiente para poder visualizar péptidos pequeños en bajas concentraciones.

Ferreira y col. (2010) estudiaron la proteólisis de las principales proteínas de la leche y del suero de quesería por la acción de los microorganismos de los gránulos de kefir mediante HPLC de fase reversa. Ellos describieron que durante el proceso de fermentación se produce una disminución significativa de  $\kappa$ -,  $\alpha$ - y  $\beta$ -caseínas y de  $\alpha$ -lactoalbúmina, la cual es dependiente de la concentración de inóculo que se utiliza. En su estudio evidenciaron un elevado grado de proteólisis de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -caseína, resultado que concuerda con lo encontrado en el presente trabajo. En cuanto a la proteólisis de proteínas de suero de leche describieron una mayor susceptibilidad a la hidrólisis de  $\alpha$ -lactoalbúmina, mientras que la hidrólisis de  $\beta$ -lactoglobulina no fue significativa, coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

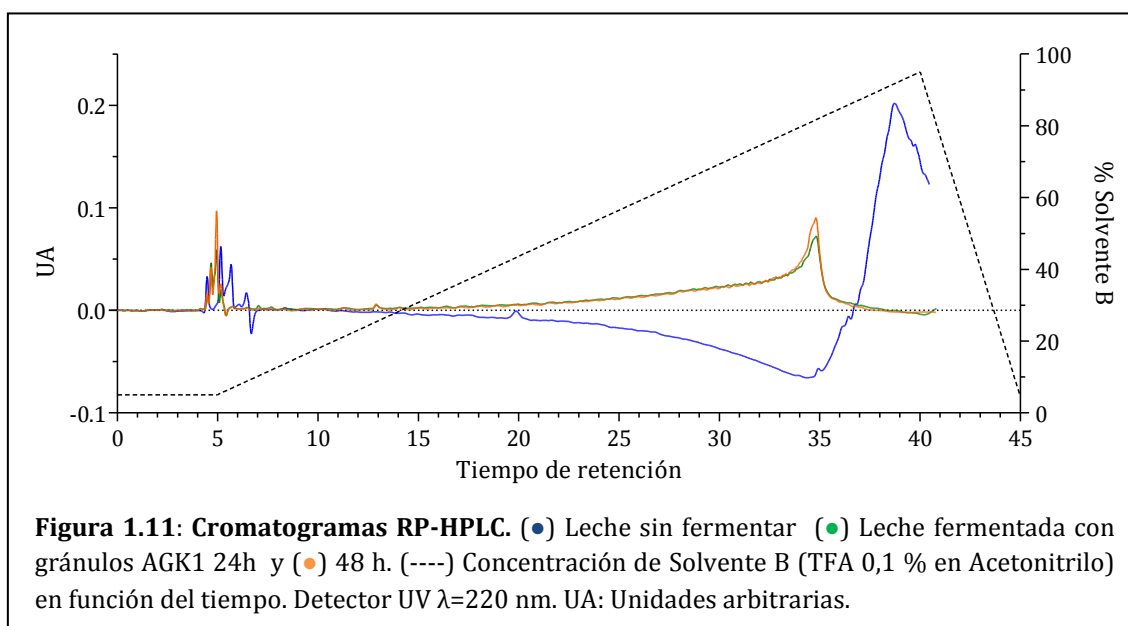
Si bien el análisis de la proteólisis generada por el consorcio microbiano de kefir ha sido relativamente poco estudiada, muchos autores han evidenciado la actividad proteolítica de cepas aisladas. Entre las cepas con capacidad proteolítica presentes en los gránulos de kefir podrían citarse *L. kefir* DR22x, productora de una proteasa extracelular (Kabadjova-Hristova y col., 2006), *Lactococcus cremoris* Z20S (Yüksekdağ y col., 2004a), *L. helveticus* MP12, *L. bulgaricus* HP1 y *L. lactis* C15 (Simova y col., 2006).

#### **1.2.2.4.3. Caracterización de los fragmentos peptídicos en la fracción no microbiana de kefir mediante HPLC de fase reversa**

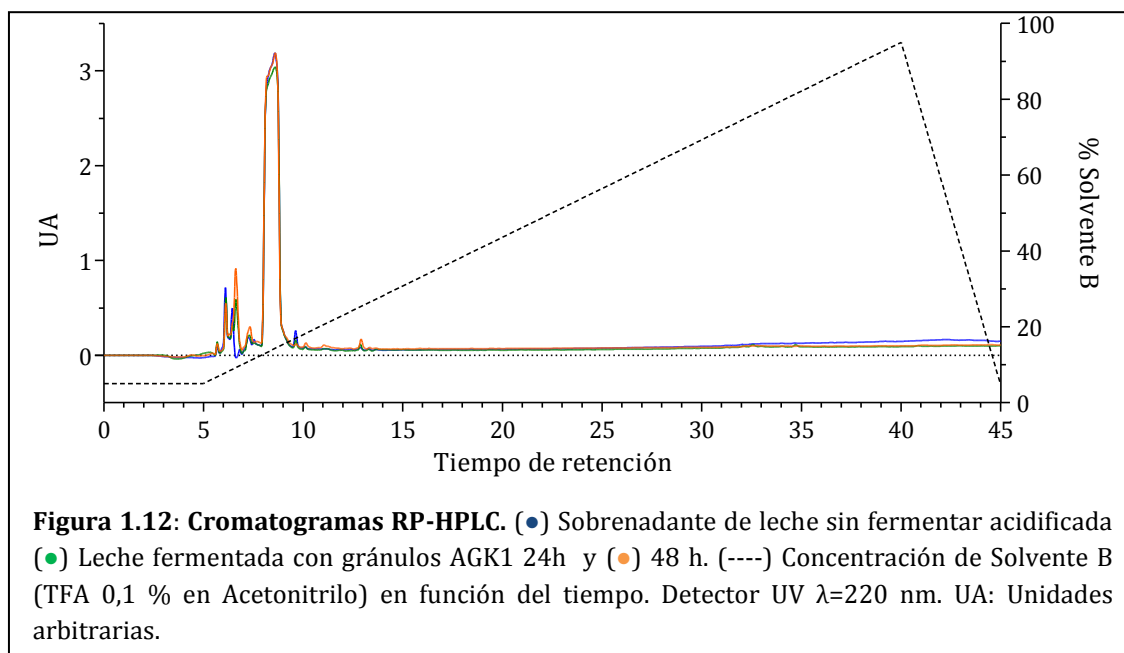
Se evaluó la liberación de péptidos durante la fermentación de leche por los gránulos de kefir mediante HPLC de fase reversa (*Reverse Phase-HPLC*, RP-HPLC) utilizando una columna de superficie hidrofóbica C18. En las Figuras 1.11 y 1.12 se presentan los cromatogramas obtenidos con un detector UV (220 nm) donde se analizó leche sin fermentar, fermentada con gránulos CIDCA AGK1 24 y 48 h y los respectivos sobrenadantes.

La señal obtenida a tiempos de retención bajos corresponderían a péptidos y proteínas solubles de carácter predominantemente hidrofílico, mientras que a mayores tiempos de retención predominarán los péptidos y proteínas más hidrofóbicos.

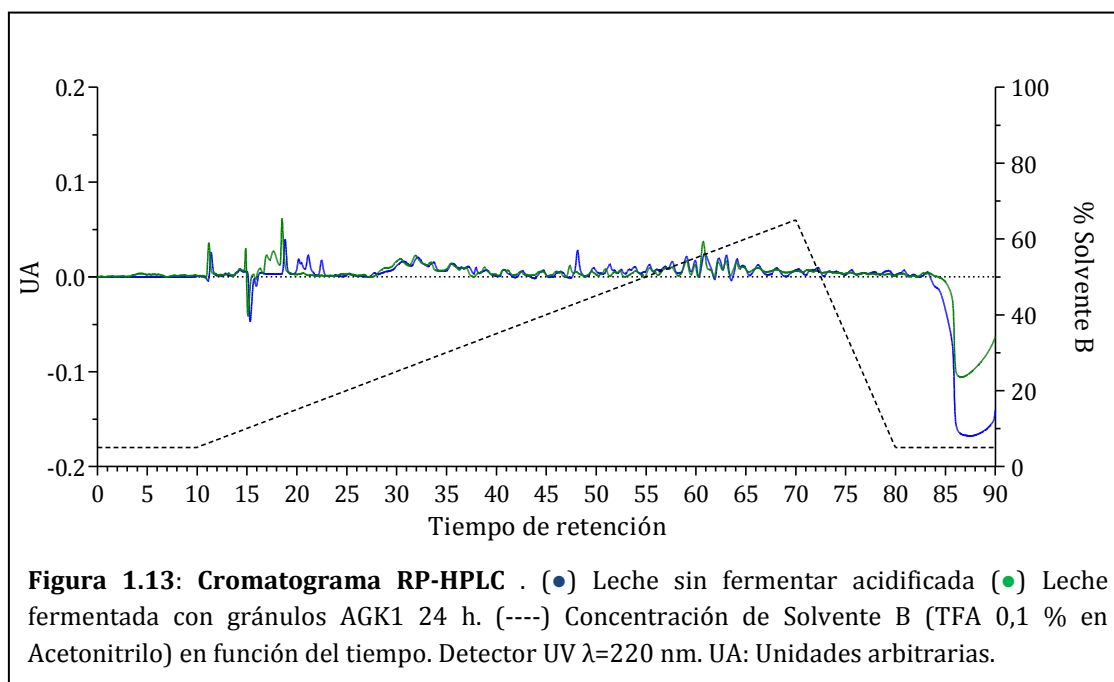
Como puede verse en la Figura 1.11, los cromatogramas obtenidos de muestras de leche y leche fermentada durante 24 y 48 h, presentaron picos acumulados entre los 5 y los 8 min, que podrían corresponder a las fracciones solubles, hidrofílicas y picos amplios y de mayor intensidad a tiempos de retención mayores que podrían corresponder a las fracciones hidrofóbicas.



Cuando se analizaron utilizando el mismo protocolo de elución y de detección, los sobrenadantes de leche acidificada artificialmente y de leche fermentada con gránulos de kefir durante 24 y 48 h después de la separación de las fracciones caseínicas, se observó un aumento en la intensidad de las fracciones hidrofílicas encontrándose muchos picos acumulados entre los 5 y 10 min y no se observaron los picos a tiempos de retención cercanos a los 35 min (Figura 1.12).



A fin de aumentar la separación de las fracciones hidrofílicas se modificó el flujo de elución (0,2 ml/min) y el gradiente de solvente B utilizado (de 5 a 65%). A continuación se presenta el cromatograma obtenido de los perfiles peptídicos de leche sin fermentar y fermentada con gránulos AGK1 sembrados al 10 % p/v durante 24h a 20 °C (Figura 1.13).



En los perfiles obtenidos mediante RP-HPLC pudieron detectarse diferencias fundamentalmente entre los 15-20 y a los 48 min, indicando que la fermentación de leche por gránulos de kefir genera cambios menores en el perfil peptídico del producto obtenido (Figura 1.13).

Ebner y col. (2015) realizaron un análisis exhaustivo del perfil de péptidos de leches fermentadas con gránulos de kefir con la finalidad de investigar la contribución potencial de péptidos bioactivos a los efectos fisiológicos de este producto. Mediante la aplicación de técnicas de proteómica y bioinformática, identificaron 257 péptidos, derivados principalmente de la  $\beta$ -caseína, seguidos de  $\alpha_{s1}$ ,  $\kappa$  y  $\alpha_{s2}$ -caseínas. De estos péptidos, un total de 236 fueron detectados únicamente en el kefir, y no en la leche sin fermentar, lo que indica que la etapa de fermentación altera la composición de la fracción peptídica. Por último, 16 de los péptidos identificados habían sido descritos anteriormente como potencialmente bioactivos, incluyendo la capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina, actividad antimicrobiana, inmunomoduladora, capacidad opioide y antioxidante.

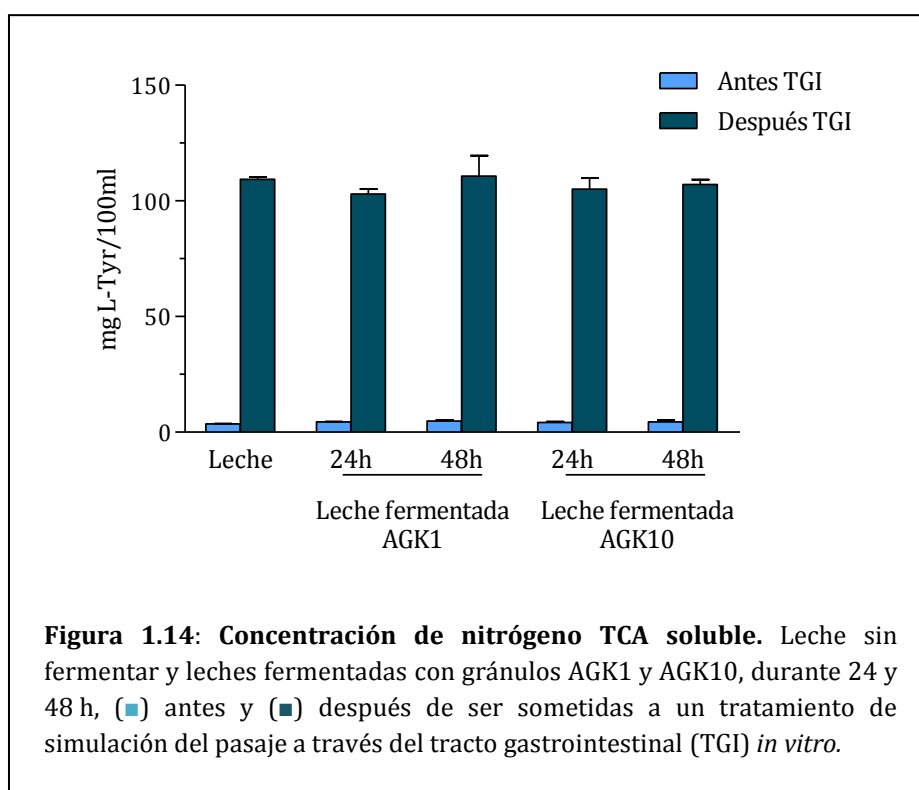
Dallas y col. (2016) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no observaron diferencias entre los perfiles de muestras de leches fermentadas con gránulos de kefir con respecto a los controles de leche sin fermentar, al igual que lo obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, mediante la aplicación de técnicas de proteómica y peptidómica realizaron un análisis más profundo sobre la liberación de péptidos en kefir, encontrando 1591 péptidos en las muestras de kefir analizadas de los cuales 609 no estaban presentes en los controles sin fermentar. Dichos fragmentos eran derivados de 20 proteínas de la leche, incluyendo  $\beta$ -caseína (38,3%),  $\alpha_{s1}$ -caseína (14,1%),  $\kappa$ -caseína (9,2%),  $\alpha_{s2}$ -caseína (4,8%) entre otras. Asimismo, como describieron también otros autores y lo obtenido en este trabajo, algunas proteínas resultaron más susceptibles a la hidrólisis que otras.

### 1.2.3. Digestibilidad de las leches fermentadas: Simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal *in vitro*

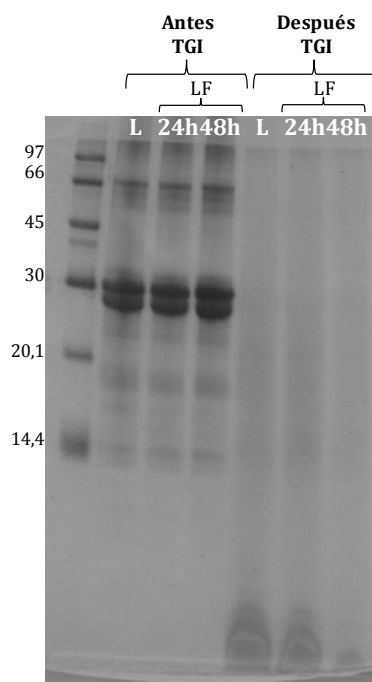
A fin de completar la caracterización de la leche fermentada se determinó la susceptibilidad de las proteínas a ser hidrolizadas por las enzimas digestivas. La digestibilidad de las leches fermentadas puede mejorar como consecuencia de la ligera predigestión enzimática de los componentes que llevan a cabo los microorganismos durante el proceso de fermentación o bien al cambio de la estructura de las caseínas al ser modificadas por el pH.

Las leches fermentadas con gránulos de kefir y leche sin fermentar, fueron sometidas a un tratamiento enzimático que simuló las condiciones a las que se enfrentan al ser consumidas y atravesar el tracto gastrointestinal. Para simular la etapa gástrica, se realizó un tratamiento con pepsina a pH 2,0 a 37 °C. A continuación se ajustó el pH a 6,3 y se simuló la etapa intestinal agregando pancreatina 0,10 % p/v y sales biliares 0,15% p/v. Finalmente se realizó un tratamiento de 5 min a 85 °C para detener la actividad enzimática.

Se analizó el contenido de nitrógeno TCA soluble y el perfil proteico/peptídico mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los resultados se presentan en las Figuras 1.14 y 1.15.



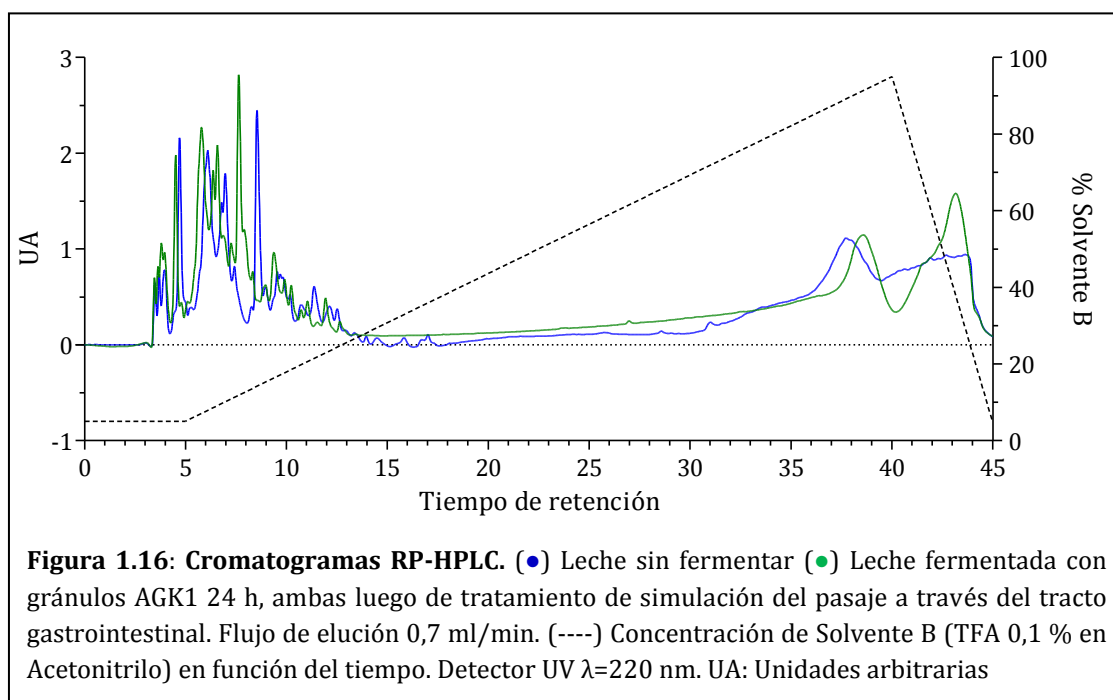




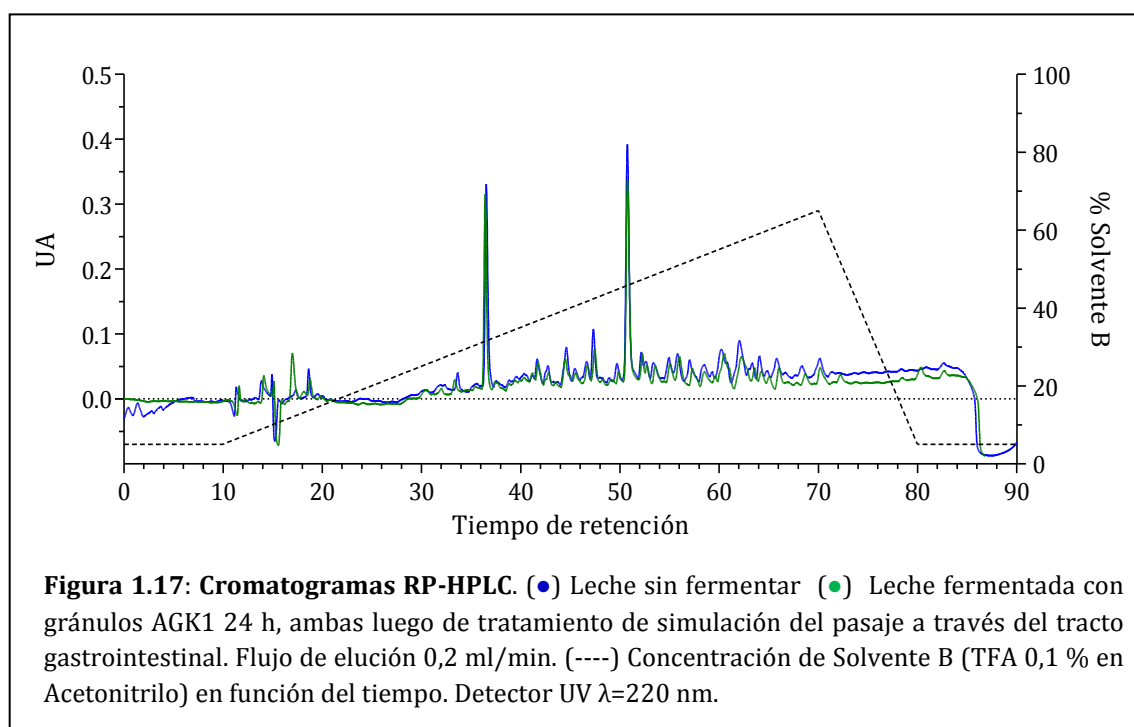
**Figura 1.15: Electroforesis en gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE.** Calle 1: Patrón marcador de peso molecular. Calle 2: Leche (L), calles 3 y 4: Leches fermentadas con gránulos de kefir CIDCA AGK1 inoculados al 10 % p/v a 20 °C durante 24 y 48 h. Calle 5: Leche (L) luego de ser sometida a tratamiento simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal (TGI). Calles 6 y 7: Leches fermentadas con gránulos de kefir CIDCA AGK1 24 y 48 h luego de ser sometidas al tratamiento de simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal (TGI).

En la Figura 1.14 puede observarse que el tratamiento enzimático produjo un aumento significativo en el contenido de nitrógeno TCA soluble. Además en la Figura 1.15, correspondiente a la imagen del gel de poliacrilamida Tricina SDS-PAGE, se observó que la leche sin fermentar y las leches fermentadas con gránulos de kefir 24 y 48 h, sin tratamiento enzimático presentaron los perfiles ya descritos, mientras que luego de la digestión simulada desaparecieron completamente todas las bandas que se encontraban en las muestras originales y se observaron nuevas bandas en la parte inferior del gel que podrían corresponder a péptidos de bajo peso molecular productos de la hidrólisis. Este hecho sugiere la hidrólisis completa de las proteínas lácteas mediante el tratamiento enzimático aplicado hasta productos con peso molecular menor al del límite de detección del método.

Mediante RP-HPLC se evaluó el perfil peptídico obtenido luego del tratamiento de simulación del pasaje a través del tracto gastrointestinal de leche sin fermentar y fermentada con gránulos de kefir (Figura 1.16).



Como puede observarse cuando se evaluaron los perfiles de la leche sin fermentar y la leche fermentada con gránulos de kefir CIDCA AGK1 inoculados al 10 % p/v durante 24 h, luego de ser sometidos al tratamiento enzimático, se obtuvieron picos apilados a tiempos de retención de entre 3 y 13 min. Por ello se analizaron nuevamente las muestras modificando el protocolo de corrida en cuanto al flujo de elución y al gradiente de concentración de solvente B (Figura 1.17).



Cuando el flujo fue de 0,2 ml/min y el gradiente 5-65% solvente B, se obtuvieron picos más separados y esto permitió determinar que los perfiles obtenidos no presentaron grandes diferencias en cuanto a la aparición de nuevos picos y/o la intensidad de los mismos entre las muestras analizadas, excepto en el pico que eluye a los 17 min que sólo se aprecia en la leche fermentada. Sin embargo, cabe destacar que péptidos diferentes podrían tener el mismo comportamiento con respecto a sus tiempos de retención en una condición de corrida determinada y de este modo, los datos obtenidos deberían complementarse con técnicas basadas en otros principios de separación y técnicas de proteómica/peptidómica para obtener resultados concluyentes respecto a la composición peptídica de los productos. Estudios previos, demuestran que la hidrólisis previa de las proteínas de la leche puede ser beneficiosa para los consumidores dado que mejora su digestibilidad. Vass y col. (1983) demostraron que la digestibilidad de una leche fermentada aumentó respecto al control y que la fermentación produjo un incremento en la tasa de crecimiento en ratas, por lo que concluyen que la fermentación de la leche mejora la digestibilidad y el valor biológico de las proteínas. En un estudio de 10 meses, Puri y col. (1994) informaron que ratas alimentadas con yogur mantuvieron su peso corporal constante con una ingesta calórica más baja que ratas alimentadas con leche sin fermentar, apuntando a una mayor eficiencia de la alimentación con la muestra de leche. Por su lado, Lee y col. (1988) informaron que la fermentación de la leche también mejoró la digestibilidad y la eficiencia de la alimentación en ratas.

En el presente trabajo se analizó el perfil peptídico obtenido luego del tratamiento de digestión simulada, a tiempo final. En estas condiciones se observaron pocas diferencias entre los perfiles obtenidos partiendo de leche sin fermentar o de kefir. Nehir y col. (2015) mediante el tratamiento de digestión simulada observaron que las proteínas de leche de cabra fermentadas con gránulos de kefir se hidrolizaron parcialmente durante la etapa gástrica y que alcanzaron más del 80% de hidrólisis después de la etapa duodenal, además no observaron diferencias entre el producto fermentado y la leche sin fermentar. Quirós y col. (2005) analizaron la liberación de péptidos en kefir obtenido en leche de cabra y evaluaron el impacto de la digestión gastrointestinal en la actividad de estos péptidos e identificaron 16 péptidos, de los cuales 2 de ellos derivados de las caseínas, presentaron actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina. Dichos péptidos fueron resistentes a la digestión simulada manteniendo su actividad, mientras que uno de los péptidos derivado de la  $\beta$ -caseína, que es una de las proteínas degradada por los gránulos CIDCA AGK1 a los 7 y 21 días de fermentación, exhibió una actividad mayor después de la digestión.

## CONCLUSIONES

- La concentración de bacterias lácticas y levaduras en los gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 fue del orden de  $10^8$  UFC/g y de  $10^6$  UFC/g respectivamente.
- Durante la fermentación de leche por gránulos de kefir se produjo un marcado descenso de pH durante las primeras horas de fermentación y alcanzó valores inferiores a 4 en 48 h. Asimismo, se consumió un 22 % de la lactosa presente inicialmente en la leche.
- Los principales productos de la fermentación a las 48 h fueron ácido láctico (125 -147 mM) y ácido acético (8-11 mM). La cantidad de ácido producido dependió del gránulo y del tiempo de fermentación.
- En ambas leches fermentadas la concentración de exopolisacárido fue de 220 mg/l.
- No se detectó un grado de proteólisis significativo en las leches fermentadas obtenidas con gránulos de kefir con 24 y 48 h de fermentación a 20 °C. Mientras que luego de 7 o 21 días, se evidenció la proteólisis parcial de caseínas y de  $\alpha$ -lactoalbúmina.
- Los perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de las leches fermentadas con gránulos de kefir presentaron diferencias menores con respecto al perfil de leche sin fermentar.
- Los perfiles proteicos obtenidos mediante RP-HPLC luego del tratamiento de digestión simulada de leche y leche fermentada con gránulos de kefir presentaron diferencias en un único pico, indicando que la fermentación no sería un factor relevante en la susceptibilidad de las proteínas a ser hidrolizadas por las enzimas digestivas.



# Capítulo 2

---

Actividad biológica de la fracción no  
microbiana de kefir

## INTRODUCCIÓN

### 1. Actividad biológica de microorganismos probióticos

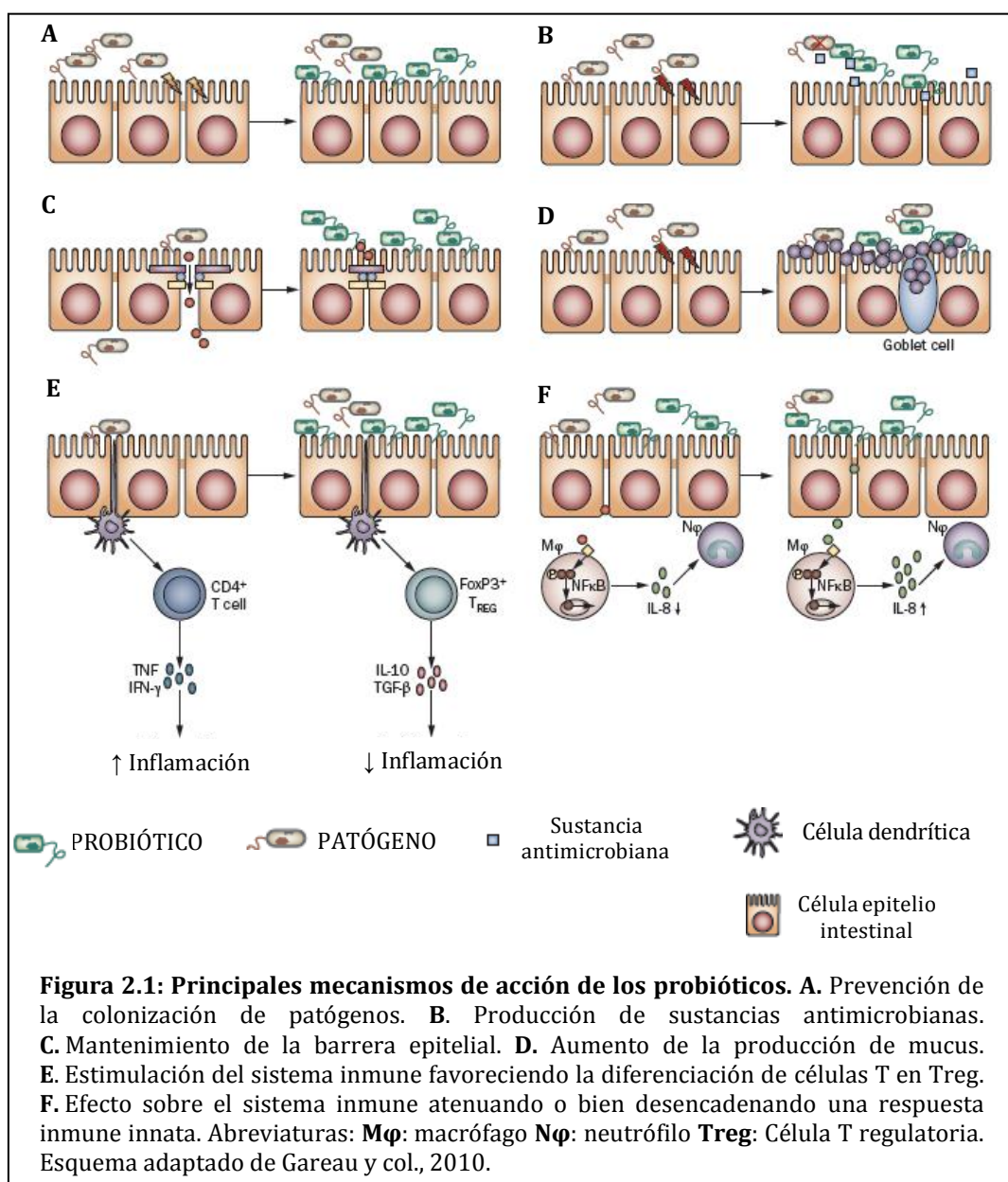
En los últimos años, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de las bacterias lácticas, para interferir con el crecimiento y virulencia de diversos patógenos, permitiendo su aplicación en la bio-preservación de alimentos, consiguiendo la ampliación de la vida útil y la seguridad frente a las bacterias que pueden afectar la salud de los consumidores (Cocconier y col., 1997; Collado y col., 2008; Vásquez Mejía y col., 2009). Además también pueden ser útiles para incluir en alimentos y combatir los patógenos entéricos en humanos y animales actuando como probióticos (Shu & Gill, 2002; Neal-McKinney y col., 2012).

Dentro de los posibles mecanismos de acción que han sido descritos para los microorganismos probióticos podrían mencionarse la prevención de la colonización de patógenos proporcionando una barrera física o mediante la producción de ácidos orgánicos, como parte de su metabolismo, disminuyendo el pH del medioambiente intestinal afectando la supervivencia de bacterias patógenas (Marteau y col., 2004; Schiffrin & Blum, 2002) o mediante la competencia con los patógenos por los nutrientes disponibles (Cummings & Macfarlane, 1997). También estos microorganismos podrían ejercer su efecto benéfico mediante la producción de bacteriocinas y/o sustancias antimicrobianas no peptídicas (Gusils y col., 2003). Se ha demostrado que ciertos microorganismos probióticos favorecen el mantenimiento de la barrera epitelial mediante el aumento de la integridad de las uniones estrechas apicales, por ejemplo, a través de la regulación positiva de la expresión de genes que codifican las proteínas de las uniones estrechas (Zyrek y col., 2007; Anderson y col., 2010; Stetinova y col., 2010; Hummel y col., 2012). Otra manera mediante la cual pueden reforzar el efecto barrera es mediante la estimulación de la liberación de mucus por las células caliciformes (Caballero-Franco, 2007) y defensinas (pequeños péptidos/proteínas activas contra bacterias, hongos y virus) por células epiteliales (Furrie y col., 2005).

Asimismo, los probióticos, principalmente bacterias lácticas y bifidobacterias, producen un efecto positivo sobre el sistema inmune, actúan eficazmente en la prevención de diversos desordenes gastrointestinales y promueven la protección del huésped (Fooks & Gibson, 2002; Zubillaga y col., 2001; Perdigon y col., 2002; Clancy, 2003; Servin & Cocconier, 2003).

Los probióticos poseen un amplio espectro de efectos inmunomoduladores ya que son capaces de actuar sobre la inmunidad innata y la adquirida. Las células epiteliales y las células del sistema inmune innato poseen receptores celulares capaces de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena, induciendo la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, etc.) y de adecuadas respuestas adaptativas destinadas a combatir a los patógenos (Werner & Haller, 2007; Hemarajata & Versalovic, 2013). Los probióticos actúan mediante la estimulación del sistema inmune innato por señalización a través de células dendríticas, que luego viajan a los ganglios linfáticos mesentéricos y conducen a la diferenciación de células T en T regulatorias (involucradas en la regulación/supresión de la inflamación) y la producción de citoquinas anti-inflamatorias, incluyendo IL-10 y TGF- $\beta$ . Algunos probióticos (o sus productos) también pueden prevenir o disparar una respuesta inmune innata mediante la producción de TNF- $\alpha$  por las células epiteliales e inhibir/activar la vía NF-kB en macrófagos y amortiguar/aumentar la respuesta inmune del huésped al influir en la producción de IL-8 y el reclutamiento posterior de células inmunes a los sitios de lesión intestinal (Figura 2.1). En ciertas situaciones patológicas, los probióticos pueden actuar sobre la respuesta inmunitaria antígeno-específica estimulando la proliferación de linfocitos y fagocitos, así como también la producción de citoquinas proinflamatorias (Chiang y col., 2000; Villena & Kitasawa, 2014).





Las propiedades de una cepa probiótica con respecto a su actividad inmunoestimuladora o bien inmunosupresora deben estar bien definidas para su adecuada aplicación (Perdigón y col., 2002). Existen numerosos reportes donde se describe el uso de microorganismos para el tratamiento de diferentes afecciones de base inmunológica como las alergias (Pelto y col., 1998; Kirjavainen y col., 2002), enfermedades inflamatorias intestinales (Lyra y col., 2010; Lee y col., 2011), enfermedad celiaca (D'Arienzo y col., 2009), etc. En estas patologías podría llegar a ser de utilidad la presencia de microorganismos que sean capaces de disminuir la respuesta proinflamatoria generada en intestino.

De acuerdo a la evidencia presentada en los últimos años, los polisacáridos producidos por las bacterias lácticas y bifidobacterias podrían tener implicancia en la modulación de la respuesta inmune, habiéndose demostrado este efecto para el kefiran (Vinderola y col., 2005, 2006a, 2006b; Wu y col., 2010; Medrano y col., 2011), así como también para EPS producidos por otros lactobacilos (Murofushi y col., 2015; Sasaki y col., 2015) y bifidobacterias (Fanning y col., 2012; Salazar y col., 2014). Asimismo otros autores asociaron la actividad inmunomodora de leches fermentadas con lactobacilos a los metabolitos y los péptidos producidos durante el proceso de fermentación (Gill y col., 2000; LeBlanc y col., 2004; Zagato y col., 2014), demostrando la relevancia de los metabolitos microbianos en el efecto benéfico. En el año 2012, Tsilingiri y col. en un novedoso modelo experimental *ex-vivo* analizaron el efecto de la incubación de microorganismos probióticos del género *Lactobacillus* y sus respectivos productos metabólicos sobre tejido intestinal de pacientes humanos sanos y con enfermedad inflamatoria. Encontraron que la adición de probiótico sobre un tejido inflamado produjo un aumento de la permeabilidad facilitando la translocación bacteriana y en consecuencia, los microorganismos normalmente inofensivos, empeoran el cuadro de inflamación. Sin embargo, la incubación de los tejidos patológicos con los sobrenadantes de cultivo de los probióticos redujo significativamente la secreción de citoquinas proinflamatorias. Estos autores definieron el concepto de “postbiótico” refiriéndose a los productos de fermentación generados por microorganismos probióticos sugiriendo que podrían utilizarse como un agente antiinflamatorio con potencial aplicación terapéutica en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal.

## OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el efecto benéfico asociado al consumo de kefir y la relevancia del rol de los metabolitos bacterianos en la actividad biológica de leches fermentadas se planteó como objetivo del presente capítulo evaluar la actividad biológica de la fracción no microbiana de kefir mediante ensayos *in vitro*, focalizando el estudio en la capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora.

### A. Actividad antimicrobiana

#### Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre el crecimiento de cepas de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*.
- Evaluar el efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre la capacidad de adhesión e invasión de *Salmonella enterica* a células epiteliales.

### B. Actividad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial

#### Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar flagelina, para utilizar como agente inductor de la respuesta inmune innata epitelial.
- Estudiar la capacidad de la fracción no microbiana de kefir de modular la respuesta inmune innata inducida por flagelina, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el sistema reportero de células en cultivo Caco2 ccl20:luc y a nivel transcripcional.
- Analizar el efecto de los componentes aislados de la fracción no microbiana de kefir en cuanto a la capacidad de modular la respuesta inmune innata epitelial.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Bacterias patógenas

Para los ensayos de actividad antimicrobiana se utilizaron como indicadores microorganismos patógenos aislados de muestras clínicas y de colección. Se usó *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis CIDCA 101 aislada en Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina provista por el Dr. H. Lopardo e identificada mediante ensayos bioquímicos tradicionales y por serotipificación mediante el empleo de anticuerpos flagelares y somáticos. También se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Bacillus cereus* ATCC 10876 pertenecientes a la *American Type Culture Collection* (ATCC).

### 2. Células eucariotas

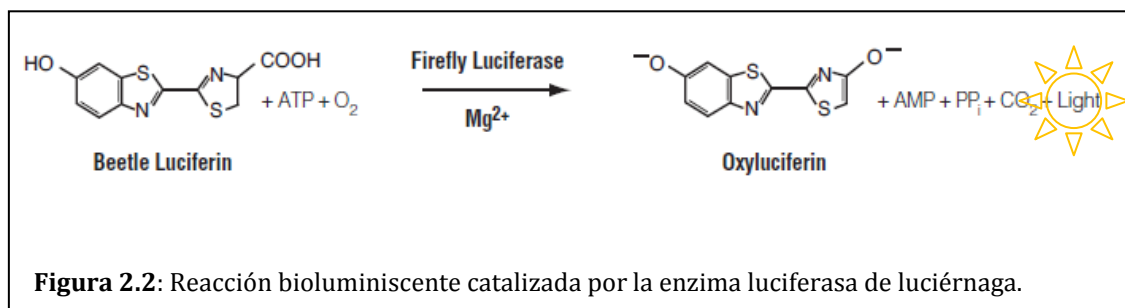
#### 2.1. Células Caco-2/TC-7

La línea celular Caco-2 es un modelo ampliamente aceptado de epitelio intestinal de origen humano proveniente de un adenocarcinoma de colon (ATCC HTB-37) que exhibe un patrón de diferenciación estructural y funcional característico de los enterocitos, como por ejemplo ribete en cepillo, uniones estrechas funcionales y alto nivel de enzimas asociadas al ribete en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa isomaltasa y aminopeptidasa (Pinto y col., 1983; Chantret y col., 1994) y que se adquieren luego de la confluencia. Esta etapa también se caracteriza por la presencia de domos, distribuidos al azar en la monocapa celular, indicando un cambio funcional en la misma, ya que su formación se debe a la secreción de sustancias hacia el dominio basolateral. La línea Caco-2/TC-7 es un clon de la línea Caco-2, cuya principal ventaja es que presenta un tiempo de duplicación de 24 h lo que le permite llegar a diferenciarse y estar en confluencia al cabo de 7 días. Se utilizaron células de la línea Caco-2-/TC7 entre los pasajes 30 a 40.

## 2.2. Sistema reportero Caco-2 ccl20:luc

El sistema reportero Caco-2 ccl20:luc consiste en la línea celular Caco-2 modificada de manera tal que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Lampryda noctiluca*) bajo el control del promotor de la quimoquina CCL20 (Nempont y col., 2008). CCL20 es una quimoquina atrayente de células dendríticas y en menor medida de macrófagos, es importante tanto en la respuesta inmune intestinal como en la formación de epitelio y tejidos linfoides asociados a mucosas. Este sistema permite evaluar de manera sencilla la respuesta proinflamatoria en diversas condiciones ya que la actividad del promotor de CCL20 es altamente inducible en la línea celular Caco-2 mediante estímulos proinflamatorios como los agonistas de los receptores tipo toll (*Toll like receptors*, TLR), por lo que se considera un indicador muy sensible de la activación de la respuesta innata (Romanin y col., 2010). En el presente trabajo se utilizaron como estímulos de la respuesta proinflamatoria flagelina, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

La actividad luciferasa del sistema es proporcional a la expresión del gen de ccl20 y para su determinación se utilizó el kit comercial “*Luciferase Assay System*” (Promega) el cual provee tanto el buffer de lisis celular como el reactivo conteniendo el sustrato de la enzima luciferasa. La medida de la actividad enzimática se lleva a cabo mediante la reacción descrita en la Figura 2.1 y es cuantificada utilizando un luminómetro dentro de los 10 seg posteriores a la reacción.



## 2.3. Cultivo y mantenimiento de células eucariotas

Las células Caco-2 ccl20:luc y Caco-2/TC-7 se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido en viales conteniendo 1 ml de medio DMEM completo (ver Apéndice) con 10 % de dimetilsulfóxido (Riedel-de Haën AG, D- 3016 Seelze, Alemania) como crioprotector. Para reactivarlas se descongeló un vial a 37 °C, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min para retirar el crioprotector, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco y se colocaron en una botella de 25 cm<sup>2</sup> (Corning Costar Co., Cambridge, MA, USA) con 4 ml de

medio DMEM completo. El cultivo se mantuvo a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>) cambiando el medio cada 2 días. A los 7 días se obtuvo una monocapa confluyente y se repicó a una botella de 75 cm<sup>2</sup>.

Antes de cada repique la monocapa se observó en un microscopio invertido para verificar su uniformidad y continuidad. Los repiques se realizaron de la siguiente manera: se descartó el medio agotado y se lavó la monocapa tres veces con PBS estéril, luego se colocaron 1,5 ml de solución de tripsina 0,25 % (Trypsin-EDTA, GIBCO, Life Technologies) y se llevó a la estufa a 37 °C durante 5 a 8 min. Cuando se observaron los primeros indicios de desprendimiento celular, se agregaron 4 ml DMEM con suero fetal bovino, para inactivar la enzima. Los 5 ml de suspensión de células se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se descartó el medio y se reemplazó por medio DMEM fresco. Se tomaron 50 µl de la suspensión de células y se mezclaron con igual volumen de una solución de azul tripán al 10 % en PBS. Se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer contando sólo aquellas células brillantes (viables).

Se preparó una suspensión de 1,5 x 10<sup>5</sup> células/ml y se sembraron 0,25, 0,5 o 2 ml por fosa en placas de 48, 24 o 6 fosas respectivamente (Greiner Bio-One). Las placas se incubaron 7 días (células en confluencia) a 37 °C en una estufa con atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub>) cambiando el medio cada 2 días.

### **3. Efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus***

Se analizó la inhibición del crecimiento de *S. Enteritidis*, *E. coli* y *B. cereus*, por la fracción no microbiana de kefir mediante un ensayo de dilución en microplaca. Se utilizaron placas de 48 fosas, que se llenaron con 300 µl de caldo nutritivo (ver Apéndice) adicionado de la fracción no microbiana de kefir, obtenida por fermentación con gránulos CIDCA AGK1 a 20 °C durante 24 h, en concentración 25, 50, 75 y 100 % (v/v) y se sembraron con una suspensión del microorganismo patógeno en solución fisiológica ajustada al 0,5 de la escala Mc Farland (~1,5x10<sup>8</sup> UFC/ml) preparada a partir de un cultivo de 18 h de la cepa en agar nutritivo. Las placas se incubaron a 37 °C, se midió la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) inmediatamente después del llenado de la placa (tiempo 0), cada una hora durante 8 h y a las 24 h. Luego se graficó la DO<sub>600nm</sub> en función del tiempo.

También se estudió la inhibición del crecimiento de *S. Enteritidis*, *E. coli* y *B. cereus*, por la fracción no microbiana de kefir mediante un ensayo turbidimétrico. Dicha fracción se analizó en condición ácida y neutralizada. Se utilizaron microplacas de 48 fosas, que se

llenaron con 300 µl de fracción no microbiana de kefir, obtenida con gránulos CIDCA AGK1 con 24 h de incubación, en las diferentes condiciones. Luego se inocularon con 5 µl de suspensión de cada microorganismo patógeno obtenida como se indicó anteriormente. Asimismo se estudió a modo de control el efecto del sobrenadante de leche sin fermentar acidificado con ácido láctico hasta igualar el pH de la fracción no microbiana de kefir (pH 3,8) y de dicho sobrenadante neutralizado, ambos filtrados por membranas de tamaño de poro 0,45 µm (Osmonics). Se incluyeron en la placa controles de crecimiento de los microorganismos y de esterilidad de las muestras y medios de cultivo. Se incubó la placa a 37 °C, se midió la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) inmediatamente después del llenado de la placa (tiempo 0), cada una hora durante 8 h y a las 24 h. Luego se graficó la  $DO_{600nm}$  en función del tiempo.

Por otro lado se estudió el efecto de la fracción no microbiana concentrada sobre el crecimiento de los patógenos mencionados anteriormente. Para ello, se preparó la suspensión 0,5 Mc. Farland del microorganismo patógeno y se inoculó sobre la fracción no microbiana de kefir obtenido por fermentación de leche 24 h a 20 °C con gránulos CIDCA AGK1, 5 veces concentrada por liofilización (ver Materiales y Métodos del Capítulo 1) en condición ácida y neutralizada. Se incubó a 37°C. A intervalos de tiempo predeterminados se tomó una alícuota y se determinó la concentración de microorganismos (UFC/ml) mediante recuento de viables en medios selectivos y diferenciales. Se utilizó agar EMB (ver Apéndice) para el recuento de *E. coli* y *Salmonella* y agar Mossel (ver Apéndice) para el recuento de *B. cereus*. Las placas de EMB se incubaron a 37 °C y las placas de Mossel 32 °C durante 24 h.

#### **4. Ensayo de asociación/invasión de *Salmonella* a células epiteliales en cultivo**

Se determinó la capacidad de asociación e invasión de la cepa de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) CIDCA 101 a células de epitelio intestinal. Se utilizaron cultivos de *Salmonella* Enteritidis en caldo nutritivo incubado a 37 °C durante 18 h y cultivos de células de la línea Caco-2/TC7 en confluencia, sembradas en placas de 24 fosas. Se realizaron dos diseños experimentales:

##### **4.1. Preincubación de *Salmonella* Enteritidis con la fracción no microbiana de kefir**

Se centrifugó el cultivo de *Salmonella* Enteritidis a 5000 xg durante 5 min y se resuspendió en PBS. La suspensión se ajustó a una densidad óptica de 0,36 ( $\sim 1 \times 10^8$  UFC/ml). Luego se diluyó en 5 ml de fracción no microbiana de kefir, obtenida por fermentación de leche con gránulos CIDCA AGK1 durante 24 h, ajustando a pH=4,5 (hasta  $2 \times 10^6$  UFC/ml) y se incubó



durante 1 h a 37 °C; mientras que el control se incubó en 5 ml de PBS. Luego, ambas suspensiones se centrifugaron (5 min a 5000 xg), se resuspendieron en el mismo volumen de DMEM base y se confirmó la concentración de *S. Enteritidis* en las mismas mediante recuento de microorganismos viables en placas de agar nutritivo. A cada fosa de la placa de cultivo celular se le agregaron 0,5 ml de suspensión de *Salmonella* en DMEM y las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5 % CO<sub>2</sub>) y luego se lavaron 3 veces con PBS para eliminar las bacterias no asociadas. Para cuantificar la **asociación** (bacterias adheridas + internalizadas), a cada fosa se le agregaron 0,5 ml de agua bidestilada estéril y se incubaron las placas 1 h a 37 °C. Esto permitió desprender la monocapa. Luego, se tomó todo el volumen de la fosa, se realizaron diluciones en triptona 0,1 % y se plaquearon en agar nutritivo. Para cuantificar las bacterias **internalizadas**, aquellas adheridas fueron eliminadas por tratamiento con un antibiótico. Luego la monocapa se lavó 2 veces con PBS y se agregaron 0,5 ml de agua bidestilada estéril (1 h a 37 °C) para lisar la monocapa y permitir que las bacterias internalizadas se liberen. Se realizaron diluciones apropiadas en triptona 0,1 % y se llevó a cabo un recuento de microorganismos viables en placas de agar nutritivo. Los resultados se expresaron como Log<sub>10</sub>UFC/fosa. Como antibiótico se utilizó gentamicina (Droguería Gatti, Argentina) en concentración 0,5 mg/ml que tiene la particularidad de que no difunde a través del dominio apical de las células por lo que las bacterias que no se internalizan son afectadas por el antibiótico y las que están internalizadas sobreviven.

#### 4.2. Preincubación de células con la fracción no microbiana de kefir

Para estos ensayos las células Caco-2/TC-7 sembradas en placas de 24 fosas se incubaron durante 1 o 16 h con la fracción no microbiana de kefir, neutralizada y filtrada, diluida 1:1 en DMEM completo. Mientras que la condición control se incubó solo con DMEM. Luego las fosas se lavaron 3 veces con PBS y a cada una se le agregaron 0,5 ml de la suspensión de *Salmonella* Enteritidis (2x10<sup>6</sup> UFC/ml) preparada en DMEM base y se realizó el ensayo de asociación e invasión como se indicó en la sección anterior.

### 5. Obtención, cuantificación y caracterización de flagelina

Para la obtención de flagelina se trabajó en cabina de Seguridad Biológica, Clase II. Se utilizó *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101. Se partió de una colonia aislada en agar nutritivo que fue inoculada en un erlenmeyer con 250 ml de caldo nutritivo. Se incubó 18 h, en agitación suave (100 rpm) a 37 °C. Luego se separó el cultivo en 6 tubos plásticos cónicos estériles y se centrifugó 30 min a 2000 xg. Los precipitados obtenidos se resuspendieron

con 1 ml de buffer PBS, de manera de lograr una suspensión densa y se transfirieron a un único tubo plástico. Se agitó la suspensión en vortex durante 3 min, se centrifugó 30 min a 2000 xg y el sobrenadante se sometió a dos etapas de ultracentrifugación a 100.000 xg durante 1,5 h a 4 °C (Beckman Coulter Optima LE-80K Preparative Ultracentrifuge). En la primera etapa se conservó el pellet obtenido. Luego, el mismo se resuspendió en 25 ml de buffer PBS y se incubó en baño de agua a 70 °C durante 10 min previo a la segunda etapa de ultracentrifugación. Finalmente se conservó el sobrenadante obtenido a -20 °C para su caracterización y utilización en los ensayos de modulación.

La cuantificación de la flagelina extraída se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), siguiendo las instrucciones del manual del usuario de un kit comercial (Thermo Scientific, Pierce BCA Protein Assay Kit). Se realizó una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina (PAA) como proteína patrón.

La flagelina obtenida se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con agente desnaturalizante (SDS-PAGE). Para ello se preparó un gel con una concentración 10 % de acrilamida y se sembraron 5 mg de proteína extraída suspendida en buffer muestra. La preparación de los geles, la siembra, corrida y coloración de los mismos se detalla en el Apéndice.

Por último se caracterizó la actividad estimuladora de la respuesta inmune innata de la flagelina extraída. Para ello, sobre un cultivo de células Caco-2 ccl20:luc confluyente en placas de cultivo de 48 fosas se realizó una curva de efecto dosis-respuesta de la flagelina extraída. Se utilizaron al menos 3 fosas para cada condición. En cada fosa se colocaron 250 µl de distintas concentraciones de flagelina previamente calentada 5 min a 60 °C en DMEM base. Se utilizaron concentraciones entre 0,02 y 10 µg/ml y un control no estimulado. Las células se incubaron por 5 h a 37 °C en estufa con atmósfera controlada 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de la incubación se retiró el medio de cultivo y se agregaron 150 µl de buffer de lisis 1X (Promega, Madison WI, USA) por fosa. Para medir la luminiscencia, se tomaron 40 µl de sustrato para luciferasa LAR (Promega, Madison WI, USA), se agregaron 8 µl del lisado en un tubo de luminometría, se agitó y se midió la luminiscencia dentro de los 10 seg posteriores en un luminómetro (Labsystems Luminoskan TL Plus).

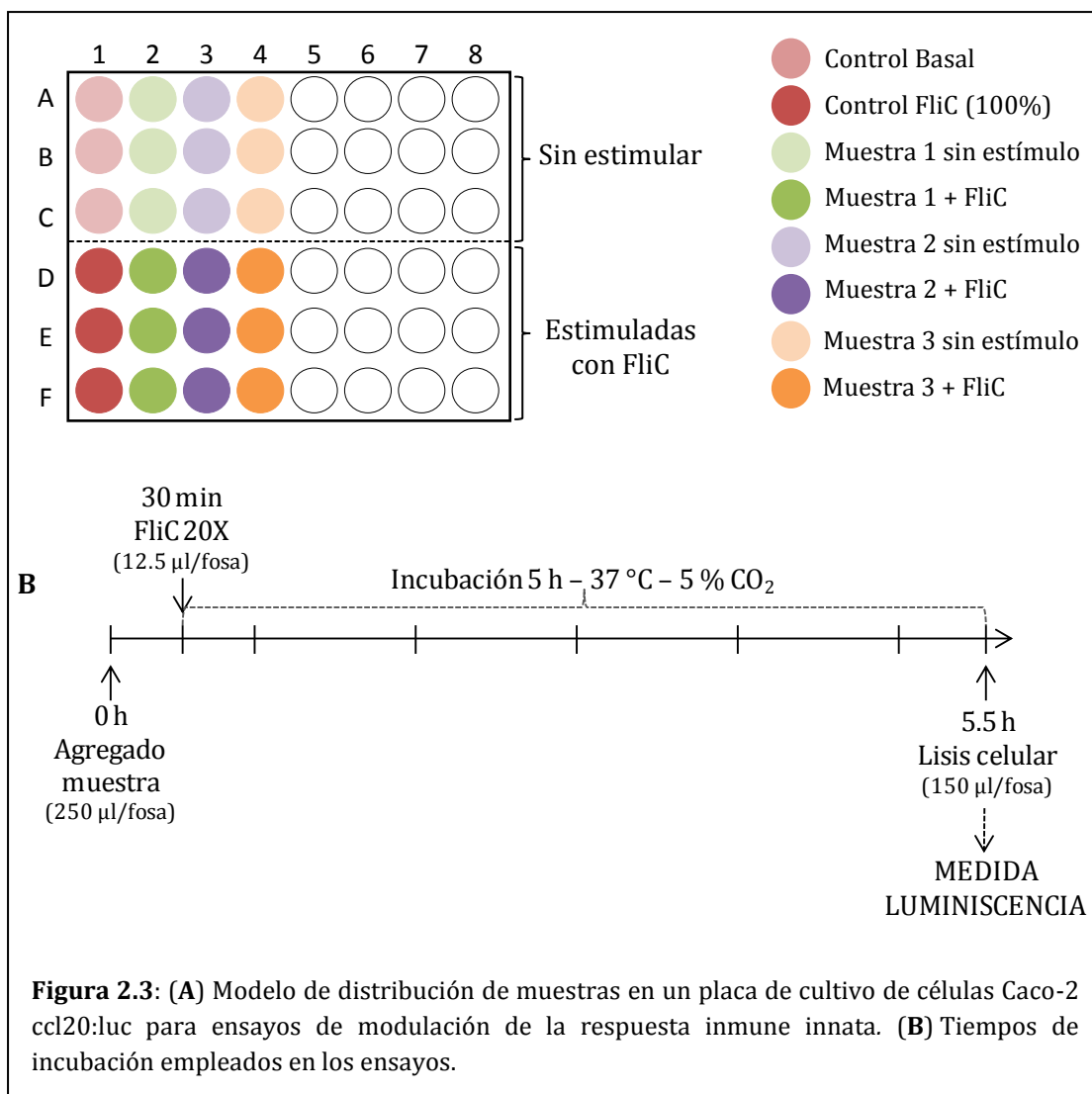
## 6. Modulación de la respuesta inmune innata: sistema reportero Caco-2 ccl20:luc

Los ensayos de modulación realizados en el presente trabajo siguieron un mismo esquema mediante el cual se analizó la capacidad de modular la respuesta inmune innata inducida por flagelina u otros agentes proinflamatorios como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , de diferentes productos: fracción no microbiana de kefir, solución de polisacáridos, sobrenadante de leche artificialmente acidificada con ácido láctico y ácido acético, soluciones de ácidos orgánicos (neutralizados y esterilizadas por filtración) y otros, que se describirán en cada ensayo particular. Previo a la realización de todos los ensayos, se verificó la integridad de la monocapa celular por observación microscópica. En los casos en que se realizaron variaciones del protocolo en cuanto al estímulo utilizado y/o tiempos de incubación, se describirán oportunamente.

### 6.1. Ensayos por luminometría

Se partió de un cultivo de células Caco-2 ccl20:luc en DMEM adicionado con un 15 % de suero fetal bovino (PAA), 24 h post-confluencia (8 días) en placa de cultivo de 48 fosas. Se adicionaron 250  $\mu$ l de muestra ya sea fracción no microbiana de kefir, soluciones acuosas de ácidos orgánicos (neutralizadas y esterilizadas por filtración) u otros tratamientos que se describirán oportunamente, en DMEM base 1:1 y se incubó 30 min, en estufa con atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>). La estimulación se llevó a cabo agregando 12,5  $\mu$ l de una solución 20X de flagelina en DMEM por fosa (concentración final 1  $\mu$ g/ml). La flagelina fue previamente calentada a 60 °C durante 5 min para eliminar posibles agregados. En ciertos ensayos se utilizó como agente inductor de la respuesta inflamatoria IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) en concentración 10 ng/ml o TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) en concentración 200 ng/ml. Luego se incubó durante 5 h en las condiciones mencionadas anteriormente; finalmente, se retiró el medio de cultivo y las células se lisaron con 150  $\mu$ l de buffer de lisis (Kit luciferasa Promega, Madison WI, USA) por fosa. En cada ensayo se incluyeron los controles de células sin tratamiento y sin estimulación (basal), los tratamientos sin agregado del agente inductor, como verificación de que los mismos no inducen por sí solos una respuesta inflamatoria y consecuentemente un aumento de la actividad luciferasa y un control correspondiente al 100 % de inducción de la respuesta inflamatoria, en el cual las células se incubaron con DMEM y se agregó con el agente inductor. En la Figura 2.3 se muestra a modo de ejemplo el diseño de una placa correspondiente a estos ensayos. Tanto los tratamientos como los controles se realizaron en triplicado de fosa en cada placa, así como también los experimentos se realizaron al menos tres veces.

La reacción de luminometría se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit Luciferase Assay System (Promega, Madison WI, USA). Se colocaron 40  $\mu$ l de reactivo de luciferasa (*Luciferase Assay Reactive*, LAR) en tubos plásticos para luminometría luego se añadieron 8  $\mu$ l de lisado celular, se agitó y se midió luminiscencia en un luminómetro (Labsystems Luminoskan TL Plus luminometer, Thermo Scientific, USA) dentro de los 10 seg siguientes. Se expresó la actividad luciferasa inducida relativa a la actividad del control que fue sólo estimulado con el agente inductor, la cual fue considerada 100%.



## 7. Evaluación de la integridad y viabilidad celular

El daño celular producido por la incubación de las células con los diferentes tratamientos se determinó mediante los ensayos que se describen a continuación.

### 7.1. Actividad enzima lactato deshidrogenasa

La integridad celular fue determinada por medición de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de las células que recibieron tratamiento y los controles sin tratamiento, antes y después de la lisis celular con Tritón X-100 utilizando un kit comercial (LDH-P unitest kit, Wiener Lab, Rosario, Argentina), de acuerdo a las condiciones de uso del fabricante. Brevemente, se prepararon cultivos de células Caco-2 ccl20:luc en placas de 6 fosas y se llevó a cabo un tratamiento análogo al realizado en los ensayos de modulación. Es decir, que las células se incubaron durante 5 h con la muestra a analizar. Transcurrido el tiempo, se midió la actividad LDH en una alícuota del medio de cultivo. A continuación llevó a cabo una lisis celular. Para ello, se retiró el medio y se reemplazó por una solución de Triton X-100 en concentración final 3 % (v/v). Luego de una incubación de 30 min a 37 °C se midió la actividad LDH en los lisados celulares, esta medida correspondió a la actividad LDH total. La actividad LDH se expresó como medida del delta de  $A_{340\text{nm}}$ /min en el medio de cultivo celular y en el lisado celular. La actividad LDH luego de los tratamientos se comparó con la de las células incubadas sólo con medio de cultivo (control).

### 7.2. Actividad enzima deshidrogenasa mitocondrial

La viabilidad celular fue controlada mediante ensayo MTT, este se basa en la conversión de la sal amarilla MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difetil tetrazolio) (Sigma St. Louis, USA) en un formazán insoluble color violeta debido a la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Luego de los tratamientos realizados de manera análoga a como se procedió para los ensayos de modulación, en placas de cultivo celular de 24 fosas, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS estéril. Luego, se incubaron en DMEM sin color con 0,05 mg/ml de MTT durante 2 h a 37 °C, en estufa con atmósfera controlada 5% CO<sub>2</sub> y en oscuridad. Finalmente se retiró el medio con cuidado de no arrastrar los cristales violetas formados y se agregaron 400 µl de DMSO por fosa para solubilizarlos. Se midió absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Sinergy HT, BioTek Instruments, USA). El porcentaje de actividad mitocondrial remanente fue calculado como:

$$\% \text{ Actividad mitocondrial} = \frac{\text{Promedio Abs M}}{\text{Promedio Abs C}} \times 100$$

Donde “*Promedio Abs M*” es la absorbancia promedio de las fosas de células tratadas (M: muestra) y “*Promedio Abs C*” es la absorbancia promedio de las fosas control, sin tratamiento.

## 8. Análisis de expresión génica *in vitro*

Para los análisis de expresión génica se partió de cultivos de células Caco-2 ccl20:luc o Caco-2/TC7, 24 h post-confluencia en DMEM en placas de 24 fosas. Se incubaron 30 min con los tratamientos a evaluar, ya sea fracción no microbiana de leches fermentadas o bien soluciones de ácidos orgánicos en las condiciones mencionadas anteriormente para los ensayos de modulación y luego se agregó flagelina previamente calentada 5 min a 60 °C (1 µg/ml) o IL-1β como agente inductor de la respuesta inflamatoria. Para estos ensayos la incubación fue de 2 h a 37 °C en estufa con atmósfera controlada 5% CO<sub>2</sub>. Luego se retiró el medio y se procedió a la extracción de ARN total como se describe a continuación.

### 8.1. Extracción de ARN total

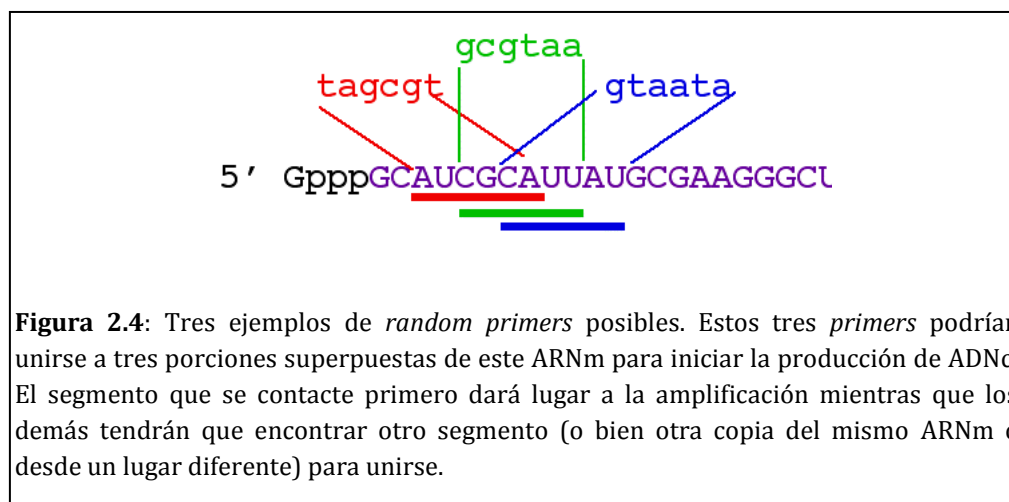
Para la obtención de ARN total se utilizó el protocolo comercial Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare UK Limited Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA). Transcurridas 2 h de la estimulación con flagelina, se retiró completamente el medio de cultivo y se agregaron 350 µl de buffer de lisis por fosa, conteniendo 1% v/v de β-mercaptoetanol y se homogeneizó completamente. El lisado celular se transfirió a un tubo plástico de 1,5 ml, se agregaron 350 µl de etanol 70 % v/v y la mezcla se dispuso en una columna de extracción de ARN para microcentrifuga con un tubo colector. Se centrifugó a 8000 xg durante 30 seg. El contenido del tubo colector se descartó. Se agregaron sobre la columna 350 µl de *buffer* de desalinización y se centrifugó a 11000 xg durante 1 min. El ADN que puede interferir en las reacciones posteriores, se eliminó agregando 95 µl de una mezcla de reacción con DNAsa (10 µl de DNAsa reconstituida en 90 µl de *buffer* de reacción para DNAsa), la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se inactivó la DNAsa colocando con 200 µl de *buffer* RA2 sobre la columna y se centrifugó 1 min a 8000 xg. Se lavó la columna 2 veces con 600 µl y 250 µl de *buffer* RA3 y se centrifugó a 11000 xg por 1 min y 2 min respectivamente para que la columna se secase completamente. Finalmente la columna se colocó en un tubo de 1,5 ml y se llevó a cabo la elución del ARN agregando 100 µl de agua libre de RNAsa y centrifugando a 11000 xg por 2 min. En estos protocolos fue indispensable el uso de material libre de RNAsa, DNAsa y pirógenos, así como

también puntas de pipetas automáticas con filtro para obtener productos de calidad y evitar pérdidas de material.

## 8.2. Transcripción reversa

La transcripción reversa (*Reverse transcription-PCR*, RT-PCR) es una técnica que permite sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El ADNc obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de ARN. Es utilizada para la cuantificación de la expresión génica, mediante la combinación con otras técnicas como por ejemplo PCR cuantitativa en tiempo real. Una de las características más importantes es que en el proceso de RT-PCR, el ADNc generado ya no lleva los intrones que sí tendría el ADN original. De este modo, al expresar el ADNc producto de la RT-PCR, se generará un ARNm formado exclusivamente por exones.

Esta técnica requiere el uso de *random primers*. Estos son secuencias cortas de ADN simple hebra (6 nucleótidos) que contienen todas las posibles combinaciones del orden de las bases nucleotídicas en el ADN, es decir  $4^6 = 4096$  posibles combinaciones. Dado que están cubiertas todas las posibles combinaciones, estos *primers* se unirán con cualquier sección del ARN presente en la muestra.



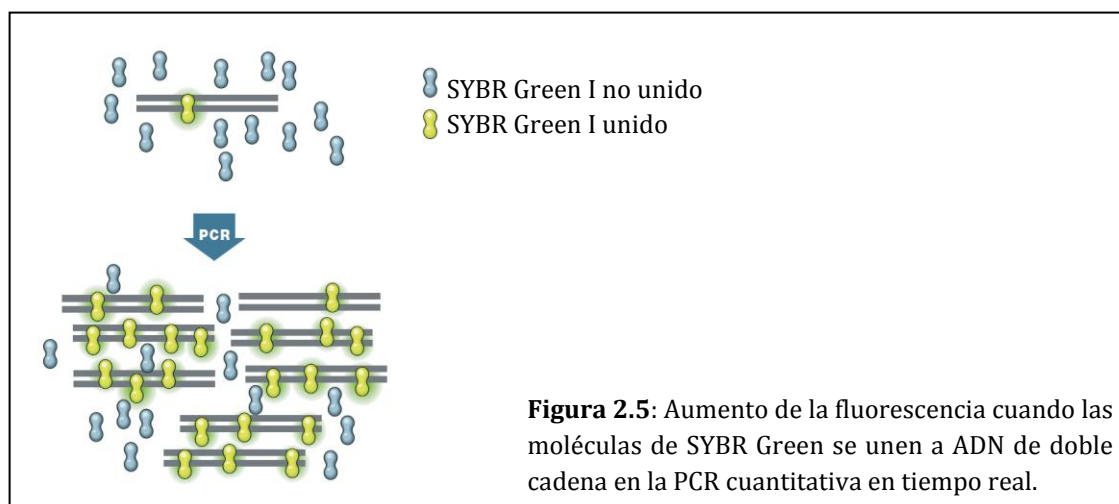
Para la transcripción reversa se preparó una premezcla con 13  $\mu\text{l}$  *Random Primers* (50  $\mu\text{M}$ ) con 91  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Luego se prepararon tubos con 1  $\mu\text{l}$  de esta premezcla y 11  $\mu\text{l}$  de muestra (1  $\mu\text{g}$  de ARN extraído) y se colocaron a 70  $^{\circ}\text{C}$  por 10 min en un bloque térmico. A continuación, se enfriaron inmediatamente en hielo y se agregaron 8  $\mu\text{l}$  de premezcla conteniendo: 1  $\mu\text{l}$  Inhibidor de RNasa, 1  $\mu\text{l}$  Ditiotritol, 4  $\mu\text{l}$  *buffer* de reacción 5X (Invitrogen), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs 10 mM, 1  $\mu\text{l}$  MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen), a cada tubo de reacción, obteniéndose un

volumen final de 20  $\mu$ l por tubo. La reacción se llevó a cabo en un ciclador térmico con el siguiente programa: paso 1) 25 °C, 10 min; paso 2) 42 °C, 2 h.

El ADNc obtenido se conservó a -20 °C.

### 8.3. PCR cuantitativa en tiempo real

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) empleando un protocolo comercial (Invitrogen) el cual utiliza una mezcla con el colorante SYBR Green I que se une inespecíficamente a ADN de doble hebra y fluoresce en verde cuando es excitado con luz azul o UV (Figura 2.5). Un aumento en la intensidad de la fluorescencia verde indica una mayor cantidad de ADN de doble hebra producto de la PCR. Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido, de forma que a mayor cantidad de producto mayor será la fluorescencia emitida. Los sistemas de PCR en tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y poseen un *software* de análisis que representa dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. Cuanto mayor sea la cantidad de moléculas que sirvan de molde, mayor será la fluorescencia. Es decir, dada una determinada intensidad en la fluorescencia (denominada umbral de fluorescencia), la muestra que tenga mayor cantidad de molde para la reacción que produce fragmento de ADN de doble cadena llegará a esa intensidad en un menor número de ciclos de reacción.

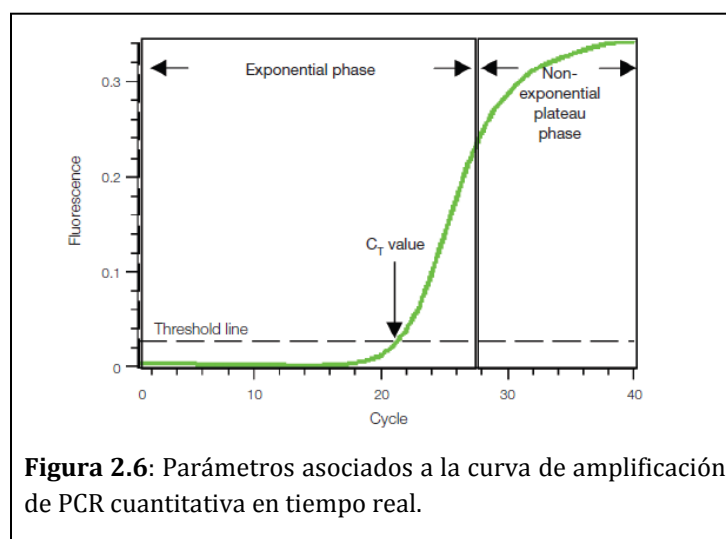


**Figura 2.5:** Aumento de la fluorescencia cuando las moléculas de SYBR Green se unen a ADN de doble cadena en la PCR cuantitativa en tiempo real.

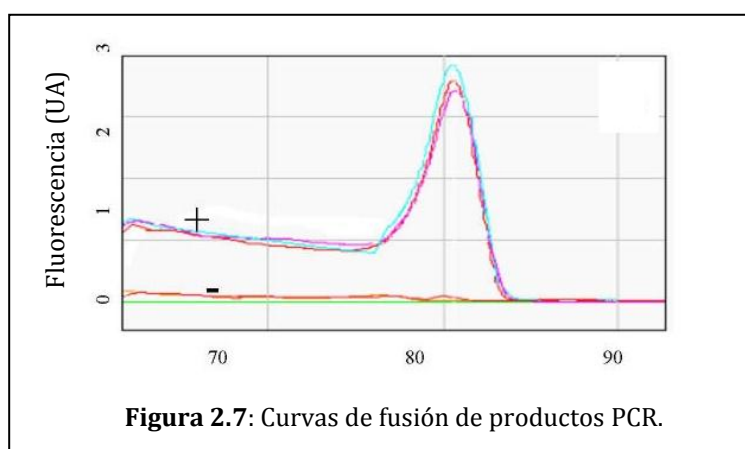
Para cada reacción se utilizó: 1  $\mu$ l Primer Forward y 1  $\mu$ l Primer Reverse (concentración final 0,5  $\mu$ M); 10  $\mu$ l dilución 1/20 de molde de ADNc; 12  $\mu$ l Master Mix (Invitrogen).



El programa de ciclado de temperaturas fue el siguiente: Paso 1: 95 °C 10 min x 1 ciclo; Paso 2: (95 °C 15 seg, 60 °C 1 min) x 40 ciclos.



La qRT-PCR permite, empleando un fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra de ADN, identificar fragmentos amplificados de DNA concretos a partir de la temperatura de fusión (o  $T_m$ , del inglés *melting temperature*), que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando; y cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación de las muestras de ADN analizadas. Una curva de fusión adecuada debería tener el aspecto que se muestra en la Figura 2.7. En ella, se observa un único producto de amplificación, mientras que si la amplificación no hubiera sido específica en esta curva aparecerían picos a diferentes temperaturas. Las curvas (+) pertenecen a diferentes tubos de reacción, mientras que las curvas (-) corresponderían a los controles donde no se agregó molde (control de reactivos) y al control al cual se agregó muestra de ARN, en lugar de ADNc.



Para el análisis de expresión génica, se utilizó  $\beta$ -actina como gen normalizador o de referencia. Los resultados se analizaron por el método de C(t) comparativo descrito por Livak y Schmittgen (2001). Brevemente, el C(t) es el ciclo de la PCR en el que se supera un determinado umbral de fluorescencia. A partir de este punto, la fluorescencia es significativamente superior a la del nivel basal. Para comparar entre muestras, para cada una se normaliza el C(t) del gen de interés respecto al gen referencia ( $\Delta C(t)$ ). Luego, se comparan los  $\Delta C(t)$  de cada muestra experimental ( $\Delta C(t)_M$ ), con el  $\Delta C(t)$  de la muestra utilizada como control ( $\Delta C(t)_C$ ) para obtener el  $\Delta\Delta C(t)$ .

La cantidad relativa en cada muestra, está definida por la siguiente fórmula:  $2^{-(\Delta C(t)_M - \Delta C(t)_C)}$

En todos los casos se chequearon los productos de amplificación analizando las curvas de fusión ( $T_m$ ) y en todas las corridas se incluyeron los controles negativos: uno con la mezcla de reacción sin ácidos nucleicos y otro con la mezcla de reacción y ARN extraído.

**Tabla 2.1:** Secuencia nucleotídica de los *primers* humanos utilizados para qRT-PCR.

Primer	Secuencia 5'-3' (directo y reverso)	Referencia
$\beta$ -actina	CCT GGC ACC CAG CAC AAT GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT	Rumbo y col., 2004
CCL20	CCA AGA GTT TGC TCC TGG CT TGC TTG CTG CTT CTG ATT CG	Rumbo y col., 2004
IL-8	CAC CGG AAG GAA CCA TCT CA GGA AGG CTG CCA AGA GAG C	Anderle y col., 2005
CXCL10	TCC ACG TGT TCA GAT CAT TGC TGA TGG CCT TCG ATT CTG G	Anderle y col., 2005
CXCL2	AGA AGT GTC CCA GAG CCC TTG CAG GGA CAG AGC CAG ACA CTG	Anderle y col., 2005
MIF	GTT CCT CTC CGA GCT CAC CCA GCA GC GCA GCT TGCT GTA GGA GCG GTTCT	Romanin y col., 2010
ITF	TCC TGG CCT TGC TGT CCT C ACG GCA CAC TGG TTT GCA G	Romanin y col., 2010
LPH	GCC AAC CCA AGT TCG AAA GAG GAC ACG CCC CAC AGA AAG TC	Anderle y col., 2005

## 9. Análisis estadístico

Los valores de actividad luciferasa relativa así como también los de expresión relativa de ARNm, se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Dunnet cuando se compararon todas las condiciones respecto a una condición control o Test de Tukey para comparaciones múltiples, con un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ . Se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

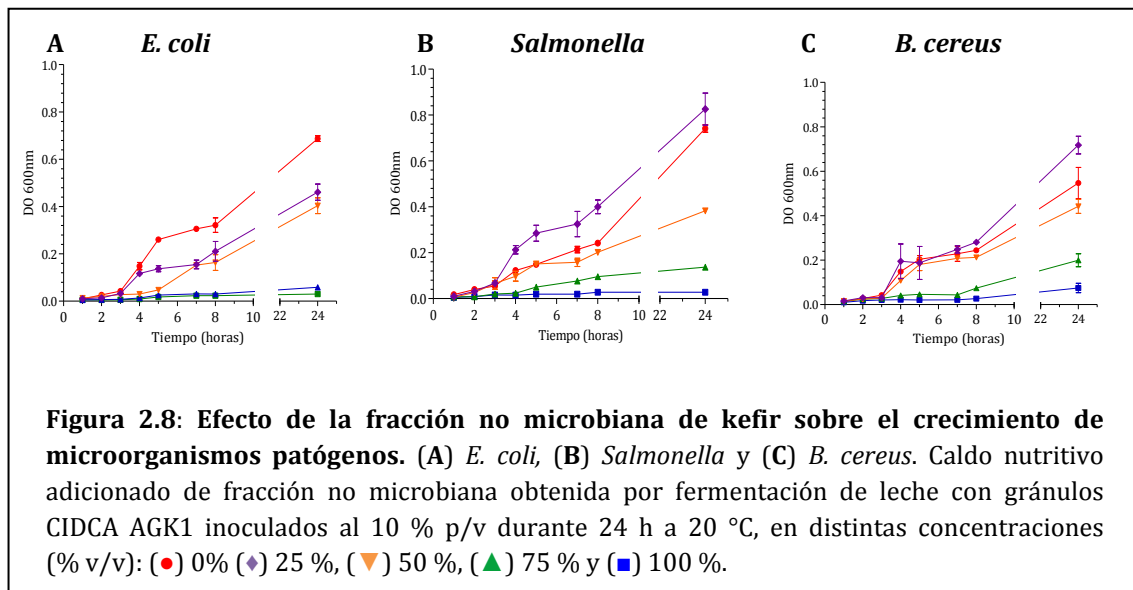
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Actividad antimicrobiana de la fracción no microbiana de kefir

#### 1. Efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre el crecimiento de *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*

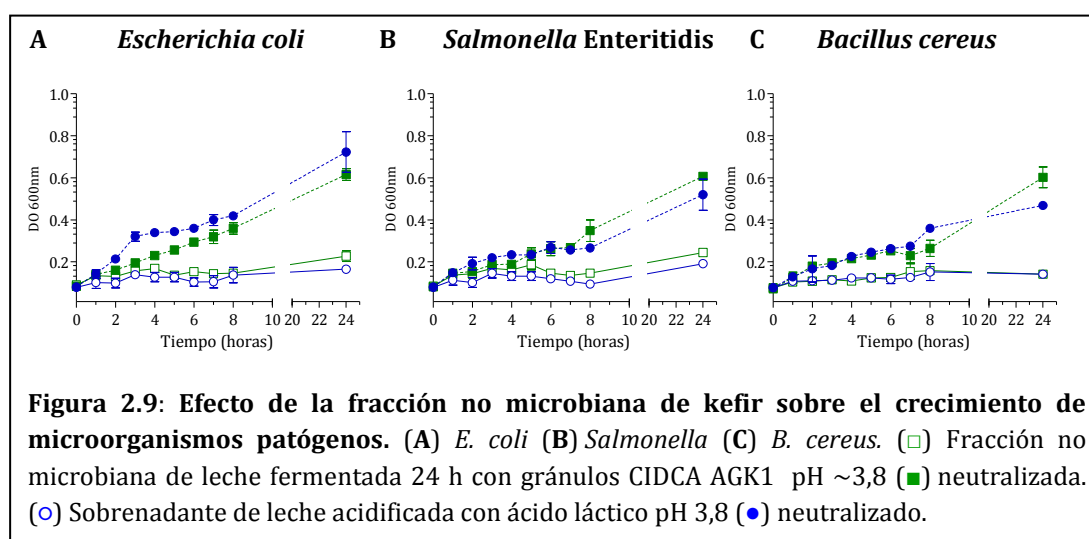
La mucosa intestinal está constantemente expuesta a microorganismos patógenos y enterotoxinas que ingresan normalmente con la dieta pudiendo inducir infecciones intestinales. Tanto *Escherichia coli* como *Salmonella enterica* y *Bacillus cereus* se encuentran entre los patógenos que constituyen un riesgo de transmisión al hombre a través del consumo de alimentos contaminados. *Escherichia coli*, es un organismo Gram-negativo, anaerobio facultativo, habitante normal del intestino de la mayor parte de los mamíferos sanos. Sin embargo, algunas cepas son patógenas y pueden encontrarse frecuentemente contaminando alimentos como la carne vacuna, lácteos, jugos de fruta no pasteurizados, verduras y agua. *Bacillus cereus* es un bacilo Gram-positivo, anaerobio facultativo, capaz de esporular. Sus bajos requerimientos nutricionales y su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas contribuyen a que se encuentre ampliamente distribuido en el ambiente (Lund & Granum 1997; Kotiranta y col., 2000). Sus esporas son capaces de resistir las condiciones de los procesos térmicos comúnmente utilizados en la industria alimentaria y por lo tanto es un contaminante frecuente de alimentos (Larsen & Jorgensen, 1999; Ghelardi y col., 2002; Schoeniy col., 2005). Los desordenes intestinales desencadenados por *B. cereus* pueden darse por la ingestión de alimentos contaminados que contengan toxinas y/o por la interacción entre las células intestinales con el microorganismo (en estado vegetativo o sus esporas). Por otro lado, *Salmonella enterica* es un patógeno intracelular, anaerobio facultativo, Gram-negativo, que está implicado en enfermedades transmitidas por los alimentos a través de la contaminación de las aves de corral, carne de cerdo, carne vacuna y productos lácteos (Burkholder & Bhunia, 2009). Todos los serotipos de *Salmonella* comparten la capacidad de invadir el huésped mediante la inducción de su propia captación por las células epiteliales intestinales. Estos tres microorganismos patógenos fueron seleccionados como indicadores para evaluar el efecto antimicrobiano de la fracción no microbiana de kefir.

Se analizó el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101 y *Bacillus cereus* ATCC 10876 en caldo nutritivo adicionado de distintas concentraciones de fracción no microbiana de kefir obtenido por fermentación de leche con gránulos CIDCA AGK1 durante 24 h a 20 °C, mediante el método de dilución en microplaca y mediciones espectrofotométricas de turbidez en el tiempo. Los resultados se presentan en la Figura 2.8.



Como se observa en la Figura 2.8, la fracción no microbiana presentó un efecto inhibitorio del crecimiento de microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos que resultó dosis-dependiente. Afectó tanto la velocidad de crecimiento como la cosecha máxima para los tres patógenos analizados. Cuando se adicionó al medio de cultivo fracción no microbiana de kefir, en concentración 50 % v/v se evidenció un aumento del tiempo de latencia del crecimiento de *E. coli* y adicionado de 75 % v/v la inhibición de este microorganismo fue total (Figura 2.8 A). El crecimiento de *Salmonella* Enteritidis se vio afectado en presencia de la fracción no microbiana de kefir en concentraciones superiores al 50 % v/v (Figura 2.8 B), mientras que *B. cereus* requirió un 75 % v/v para inhibir su desarrollo (Figura 2.8 C).

Posteriormente se evaluó el desarrollo de *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis y *Bacillus cereus* en la fracción no microbiana de kefir elaborado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 pH~3,8 y neutra. Las curvas de DO<sub>600nm</sub> en función del tiempo obtenidas se muestran en la Figura 2.9.



Se observó que la fracción no microbiana de leches fermentadas con gránulos de kefir CIDCA AGK1, así como el sobrenadante de leche acidificada con ácido láctico, en la concentración encontrada en el producto fermentado, a pH 3,8 inhibieron el crecimiento de cepas de *E. coli*, *Salmonella* y *B. cereus*. Por el contrario, ambas muestras al ser neutralizadas perdieron completamente este efecto inhibitorio. Estos ensayos demuestran que los ácidos orgánicos presentes en la fracción no microbiana de kefir serían los responsables del efecto inhibitorio de los patógenos, debido fundamentalmente a su contenido de ácido láctico no dissociado ya que se observa una pérdida de actividad cuando se neutraliza. Estos resultados también coinciden con los reportados por otros autores donde analizan la actividad antimicrobiana de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus* contra patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, y describen que la neutralización de los sobrenadantes de cultivo redujo los efectos inhibitorios, por lo que sostienen que uno de los principales mecanismos puede resultar de la producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de la glucosa y la consiguiente disminución del pH (Rossland y col., 2003; De Keersmaecker y col. 2006; Tejero-Sariñena y col, 2012). Cabe destacar que se obtuvieron resultados equivalentes para la fracción no microbiana de kefir obtenida con ambos gránulos y que además el efecto a pH ácido resultó bactericida dado que estrías realizadas en agar nutritivo, luego de 24 h de incubación de los patógenos en las mismas, no presentaron desarrollo.

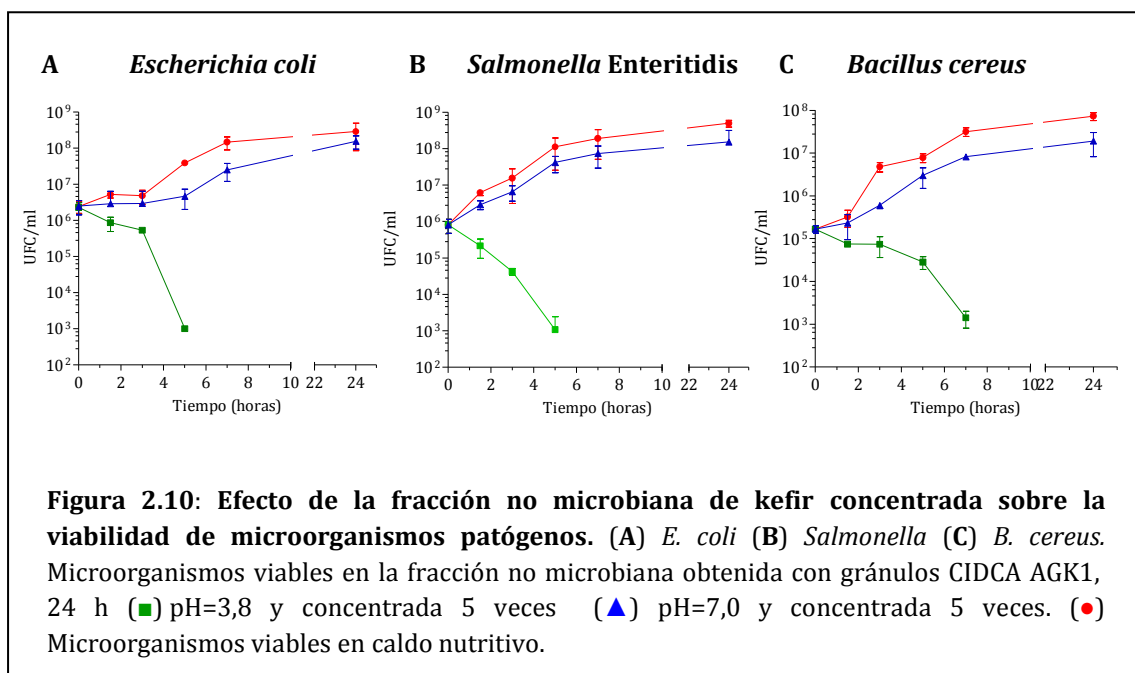
Los datos obtenidos indican que la fermentación de leche con gránulos de kefir evita la proliferación de microorganismos patógenos que eventualmente pueden actuar como

contaminantes, contribuyendo de este modo a la calidad y seguridad del producto obtenido.

La compleja composición del consorcio microbiano que conforma los gránulos de kefir otorgaría ciertas ventajas en cuanto a la capacidad inhibitoria, potenciando este efecto, respecto a las cepas aisladas. Ridwan y col. (2008) estudiaron la actividad antimicrobiana de un probiótico multiespecie (*Ecologic 641*) contra una colección de patógenos obtenidos a partir de una infección pancreática y observaron que si bien todas las cepas individuales incluidas en la preparación fueron capaces de inhibir el crecimiento de los patógenos, la combinación de cepas, presentó un efecto inhibitorio mayor. Además observaron que cuando el pH de los sobrenadantes fue ajustado a pH=7, perdieron la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, por lo que las propiedades antimicrobianas del probiótico multiespecie *Ecologic 641* son explicadas por la producción de ácidos orgánicos.

## 2. Estudio del crecimiento de patógenos en la fracción no microbiana de kefir concentrada

Con el objetivo de evidenciar la presencia de componentes antimicrobianos que pudieran encontrarse en baja concentración, la fracción no microbiana de leche fermentada con gránulos de kefir CIDCA AGK1 ácida y neutralizada se concentró 5 veces por liofilización y se analizó el crecimiento/supervivencia de los patógenos mediante recuento de microorganismos viables en medios selectivos en función del tiempo de incubación (Figura 2.10).



Mediante la realización de recuentos de microorganismos viables en función del tiempo se observó que la fracción no microbiana de kefir en condiciones ácidas, concentrada, tiene un efecto bactericida sobre los patógenos estudiados. La concentración de microorganismos viables se redujo hasta límites no detectables en 5 h para *E. coli* y *Salmonella* y en 7 h para *B. cereus*. Cuando la fracción no microbiana concentrada es neutralizada, se perdió el efecto bactericida. Por lo tanto, puede decirse que concentrando 5 veces no se evidenció la contribución de otros componentes antimicrobianos de la fracción no microbiana kefir, a menos que su actividad también dependa del pH hecho que no se puede diferenciar con estos ensayos. El kefir posee otros metabolitos antimicrobianos además de los ácidos orgánicos, tales como etanol, acetona, acetaldehído (Guzel-Seydim y col., 2000; Beshkova y col., 2003), diacetilo (Beshkova y col., 2003), CO<sub>2</sub> (Garrote y col., 1997; Grønnevik y col., 2011) y otros (Rodrigues y col., 2005; Barbosa y col., 2011). Asimismo cepas aisladas de kefir son capaces de producir bacteriocinas (Powell y col., 2007), las cuales poseen actividad antibacteriana contra ciertos tipos de microorganismos, generalmente relacionados con las bacterias productoras. Sin embargo la contribución de dichos componentes en el efecto antimicrobiano del kefir no ha podido dilucidarse completamente.

El uso de ácido láctico es uno de los métodos más antiguos empleados para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Helander y col., 1997). En su forma no disociada, este ácido orgánico puede atravesar las membranas bacterianas y así bajar el pH intracelular causando efectos adversos en numerosas funciones celulares (Presser y col., 1997; Carpenter & Broadbent, 2009). Además, también funciona como un permeabilizador de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, y así puede potenciar los efectos de otras sustancias antimicrobianas (Alakomi y col., 2000).

Teniendo en cuenta el pH, la concentración de ácido y la constante de disociación del mismo, se calculó la concentración de la forma no disociada del ácido láctico en la fracción no microbiana de kefir obtenida por fermentación con gránulos AGK1 y fue de 46,8 mM. La dilución mínima de la fracción no microbiana en medio de cultivo que presentó efecto inhibitorio del crecimiento de patógenos (Figura 2.8) fue del 75 % v/v lo cual representaría una concentración de ácido láctico no disociado de 35,1 mM. Cuando se adicionó en concentración 50 % v/v la concentración de ácido láctico no disociado correspondería a 23,4 mM y dicha concentración no produjo inhibición. Los resultados obtenidos en el presente trabajo refuerzan la idea sostenida por varios estudios en los que proponen que la actividad inhibitoria del crecimiento de patógenos de los productos

fermentados sea atribuida a la disminución del pH debido a la producción de ácido láctico como producto final del metabolismo de las bacterias lácticas.

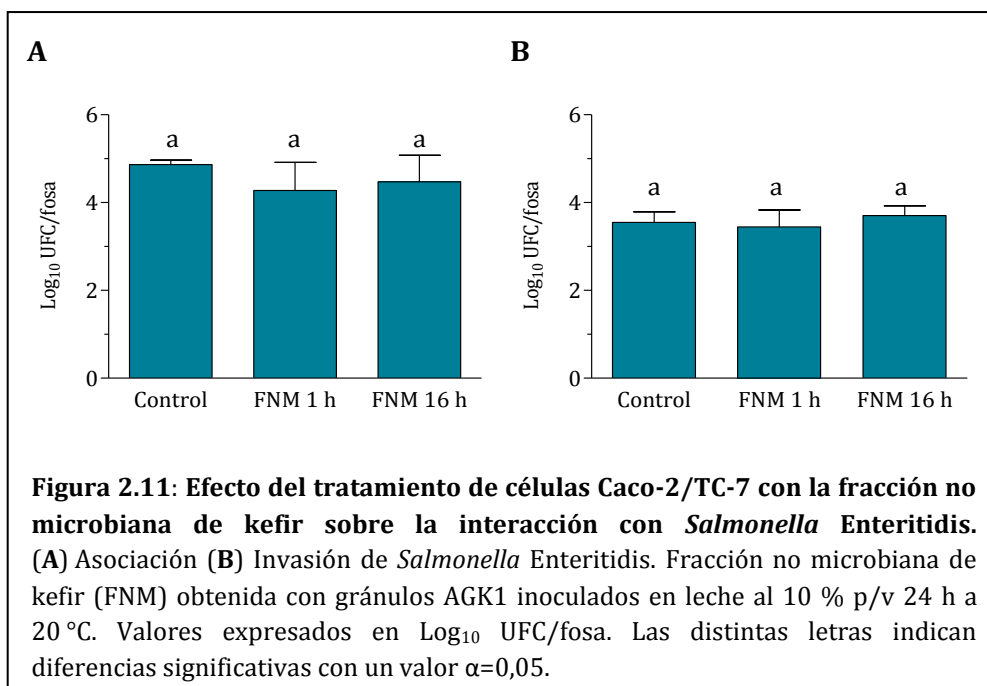
### 3. Efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre la asociación/invasión de *Salmonella* a células Caco-2/TC-7

Los cultivos de células *in vitro* han sido de gran utilidad para comprender la interacción entre *Salmonella* y las células eucarióticas (Ochoa & Rodriguez, 2005). Utilizando el modelo de células de epitelio intestinal Caco-2/TC7 se analizó la capacidad de asociación e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101 (*Salmonella* Enteritidis) y se evaluó el efecto de la preincubación tanto de las células como del patógeno con la fracción no microbiana de kefir.

Después de la ingestión de agua o alimentos contaminados con *Salmonella*, este patógeno inicia su ciclo de infección invadiendo las células del huésped. Para el desarrollo de la enfermedad en primer lugar la *Salmonella* se adhiere al epitelio intestinal a través de fimbrias que le permiten conseguir un contacto estrecho con los enterocitos y constituyen un importante factor de virulencia ya que le permite a la bacteria resistir al fluido luminal. El proceso de internalización esta mediado por el sistema de secreción tipo III codificado por la isla de patogenicidad 1 (SP1-1). A través de este sistema el patógeno envía numerosos efectores a la célula epitelial que inducen cambios en las mismas al interferir en sus vías de señalización (Ochoa & Rodriguez, 2005). La invasión de *Salmonella* a las células epiteliales, implica desaparición de las microvellosidades de la célula epitelial y la inducción de cambios en el citoesqueleto de actina que causan el enrulamiento (*ruffling*) de la superficie celular y la inclusión del patógeno en vacuolas (Galán & Wolf-Watz, 2006). Las bacterias internalizadas residen en las vacuolas, obtienen los nutrientes de las células eucariotas y esto permite su crecimiento intracelular (Martinez-Moya y col., 1998).

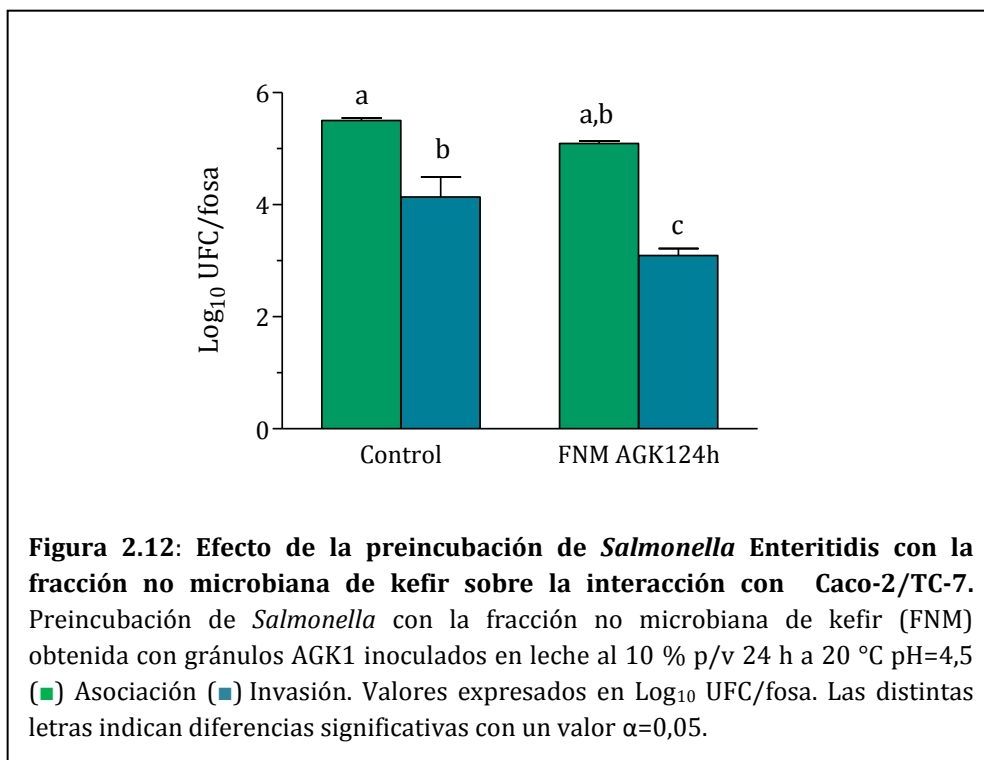
A fin de analizar si la fracción no microbiana inducía algún cambio o acondicionamiento en las células epiteliales con la consecuente protección del epitelio frente a la infección por este microorganismo, se analizó el efecto de la preincubación de las células con la fracción no microbiana de kefir, neutralizada, en la asociación/invasión de *Salmonella* Enteritidis (Figura 2.11).





Sobre un total de  $10^6$  UFC de *Salmonella* añadidas por fosa de cultivo celular, la asociación es del orden de  $10^5$ , mientras que las bacterias que invaden se encuentran en el orden de  $10^3$ . Como se observa en la Figura 2.11 A y B, la preincubación de células con la fracción no microbiana de kefir no ejerció ningún efecto sobre la asociación o invasión de *Salmonella* Enteritidis a células epiteliales, indicando que los componentes presentes en la fracción no microbiana no produjeron cambios en la célula que modifiquen la interacción con el patógeno.

Se analizó el efecto de la incubación de *Salmonella* Enteritidis en la fracción no microbiana de kefir sobre la capacidad de adherirse e invadir las células epiteliales (Figura 2.12). Para ello el pH de la fracción no microbiana fue ajustado a pH 4,5 a fin de mantener la *Salmonella* viable durante el tiempo de ensayo (1 h 37 °C).



Como se observa en la Figura 2.12, cuando *Salmonella* Enteritidis fue tratada con la fracción no microbiana de kefir a pH 4,5 no se obtuvieron diferencias significativas en la asociación del patógeno a células epiteliales mientras que disminuyó significativamente su invasión. Este resultado indica que moléculas presentes en la fracción no microbiana de kefir como ácidos orgánicos, exopolisacáridos y/o proteínas/péptidos alterarían los mecanismos de patogénesis ejercido por *Salmonella*.

Resultados similares en cuanto a la disminución de la capacidad de invasión de *Salmonella* a células de epitelio intestinal fueron reportados por Londero y col. (2015) quienes utilizaron sobrenadante de suero de leche fermentado con gránulos de kefir. Asimismo Hudault y col. (1997) demostraron que el pretratamiento de *Salmonella* con sobrenadante de cultivo de *L. casei* GG también disminuyó la capacidad de invasión del patógeno. Coconnier y col. (2000) informaron que el sobrenadante de cultivo de una cepa *L. acidophilus*, altera la capacidad de asociación e invasión de *S. enterica* serovar Typhimurium a células Caco-2/TC-7 y que además inhibe el desarrollo intracelular del patógeno. Golowczyc y col. (2007) demostraron que la proteína de capa-S presente en sobrenadantes de cultivos de cepas de *L. kefir* se asocia con estructuras de la superficie de *S. enterica* y es la responsable de la disminución de la capacidad del patógeno de invadir

células epiteliales. Esta proteína podría encontrarse en leche fermentada con gránulos de kefir, pudiendo contribuir al efecto observado en el presente trabajo.

Tellez y col. (2011) demostraron que la fermentación de leche con *L. helveticus* libera una fracción peptídica, derivada de  $\alpha$ -lactoalbúmina y  $\beta$ -caseína, que posee un papel importante en la protección contra la translocación de *Salmonella* en ratones. Otros autores han reportado que los ácidos grasos de cadena corta pueden afectar la expresión de genes asociados con la capacidad de invasión de *Salmonella*, disminuyendo o magnificando el proceso según el tipo de ácido y su concentración (Altier, 2005). Asimismo, algunos autores atribuyen el efecto de sobrenadantes de cultivos de bacterias lácticas en la disminución de la invasión de *Salmonella* a la presencia de ácido láctico (Makras y col., 2006).

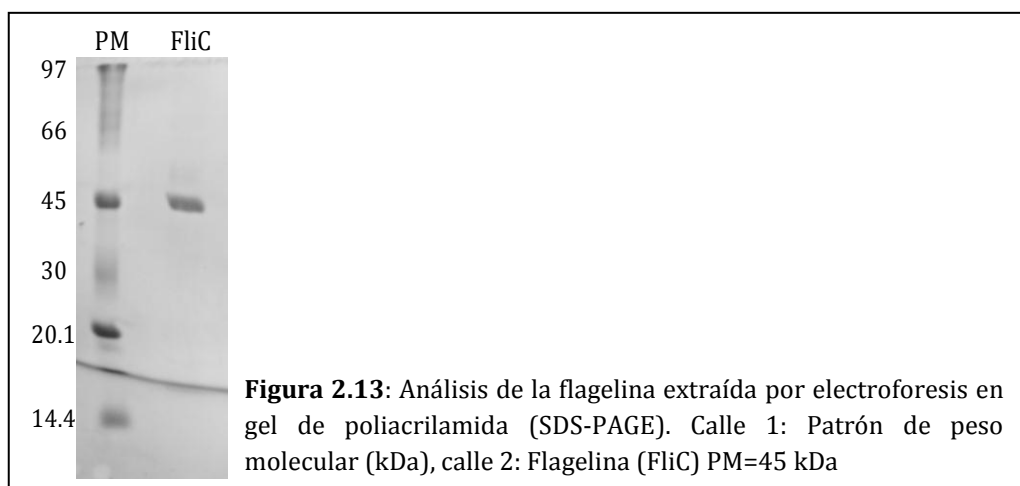
En el presente estudio se demostró que la preincubación de células con la fracción no microbiana de kefir, no incidió sobre la capacidad de asociación/invasión de *Salmonella*, a células, mientras que la incubación del patógeno en la fracción no microbiana de kefir redujo su capacidad de invasión a los enterocitos, sin embargo más estudios serían necesarios para determinar en qué medida este efecto se debe a la presencia de ácidos orgánicos u otros metabolitos que interfieran en los mecanismos de invasión del patógeno.

## B. Actividad inmunomoduladora de la fracción no microbiana de kefir

### 1. Obtención, cuantificación y caracterización de flagelina

En el lumen del tracto digestivo hay grandes cantidades de flagelina (FliC) ya que esta molécula está presente en muchos microorganismos, no necesariamente patógenos. El receptor TLR5 reconoce la flagelina de diversas bacterias, esto puede actuar como un sistema de detección precoz que desencadena una respuesta rápida del huésped (Hughes & Galan, 2002; Ramos y col., 2004). La flagelina utilizada como estímulo proinflamatorio en los ensayos de inmunomodulación sobre células de epitelio intestinal realizados a lo largo de este trabajo, fue obtenida por un proceso de disrupción de los flagelos bacterianos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, seguido de una separación por ultracentrifugación tal como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Una vez obtenida la flagelina, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) para corroborar su presencia en la suspensión y se cuantificó la concentración de proteína por el método del ácido bicinónico.

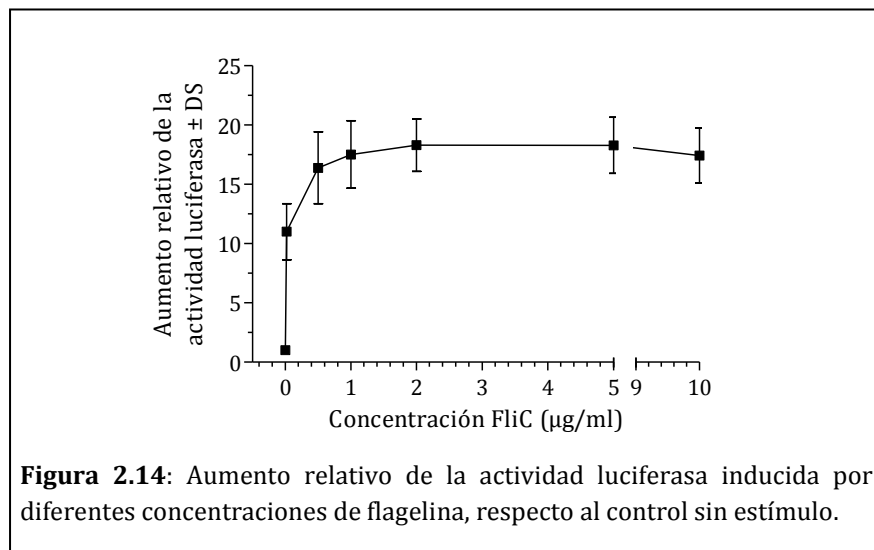
En el gel obtenido se observó una única banda de 45 kDa correspondiente a la flagelina aislada (Figura 2.13). La suspensión presentó una concentración de 290 µg de proteína/ml. A partir de ésta, se preparó una suspensión en DMEM base en concentración 25 µg/ml, para su utilización en todos los ensayos.



El siguiente paso en la caracterización de la flagelina consistió en evaluar su actividad estimuladora de la respuesta inmune innata de células epiteliales utilizando el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc. En la naturaleza, la expresión de las quimoquinas es inducida por factores proinflamatorios externos. Como consecuencia de la unión de la flagelina a TLR5 se dispara una cascada de señales que acaba en la translocación al núcleo de factores de transcripción tales como NF-κB que se unen a los promotores de genes proinflamatorios

aumentando la expresión de los mismos. Cuando se induce la respuesta inflamatoria con flagelina, las células en cultivo responden con alta sensibilidad mediante la producción de la quimioquina CCL20 que es un quimioattractante de linfocitos y células dendríticas a través del epitelio, haciendo de este gen un buen marcador para evaluar la respuesta proinflamatoria. La actividad luciferasa del sistema es proporcional a la expresión del gen de CCL20. La medida de dicha actividad se llevó a cabo mediante una reacción de luminiscencia, que es cuantificada utilizando un luminómetro.

En primera instancia se realizó un ensayo sobre células Caco-2 ccl20:luc para analizar el aumento de la actividad luciferasa inducida por diferentes concentraciones de flagelina. Este aumento da como resultados valores mayores de luminiscencia, los cuales se normalizaron respecto a los valores correspondientes al control de células sin estimular (Figura 2.14).



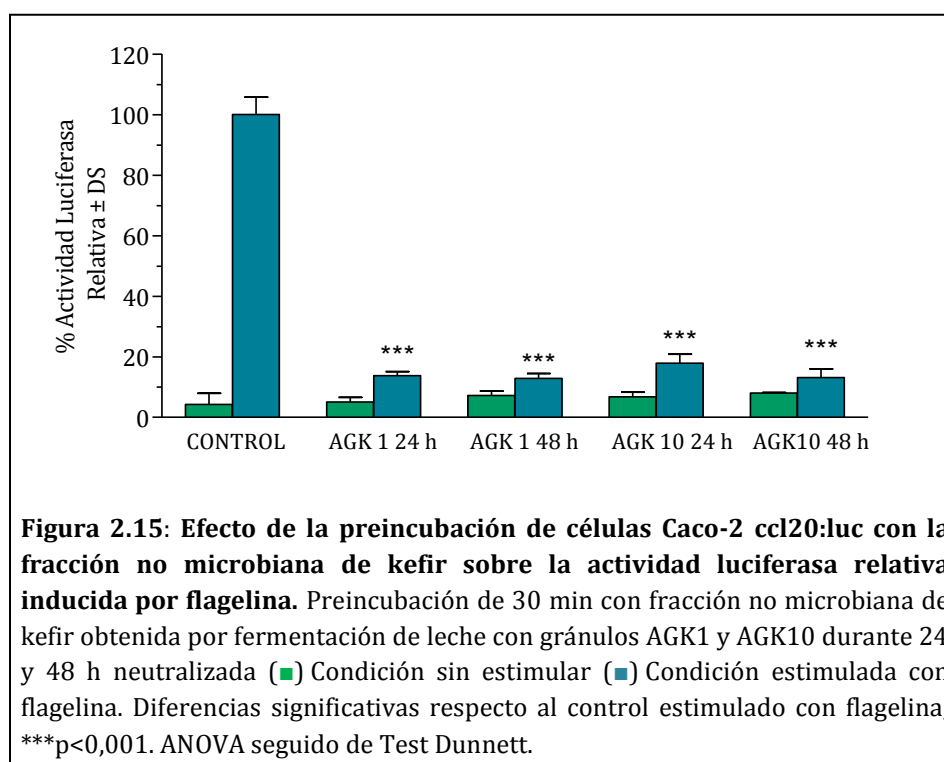
Este ensayo permitió comprobar que el aumento de la actividad luciferasa sigue un efecto dosis-respuesta. Además se observó que utilizando una concentración de flagelina de 0,5 µg/ml se alcanza un nivel máximo de estimulación de las células, lo que podría estar indicando que existe una saturación del receptor TLR5. Como puede observarse en la Figura 2.14 la actividad luciferasa de las condiciones estimuladas con flagelina en concentración igual o superior a 0,5 µg/ml es 17 veces superior al control sin estímulo. De acuerdo a este resultado, se utilizó en los ensayos siguientes una concentración de 1 µg/ml que garantiza un nivel máximo de actividad luciferasa inducida.

## 2. Modulación de la respuesta inmune innata epitelial *in vitro* por la fracción no microbiana de kefir

### 2.1. Ensayo en sistema reportero Caco-2 ccl20:luc

Con el objetivo de estudiar la capacidad de modular la respuesta inmune innata de la fracción no microbiana de leche fermentada con gránulos de kefir, se utilizó el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc con el mismo formato de ensayo descrito en la sección anterior. En todos los ensayos se incluyeron al menos 3 fosas incubadas sólo con DMEM base, sin estimulación (condición basal) y al menos 3 fosas incubadas con DMEM base estimuladas con flagelina, correspondientes al 100% de inducción de repuesta inflamatoria. Las fracciones no bacterianas analizadas fueron neutralizadas previamente y filtradas. Transcurridas 5 h, se lisaron las células y se llevó a cabo la reacción de luminiscencia.

Se analizó la fracción no microbiana de leches fermentadas obtenidas con gránulos de kefir CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 durante 24 y 48 h de incubación a 20 °C, obteniéndose los siguientes resultados (Figura 2.15).

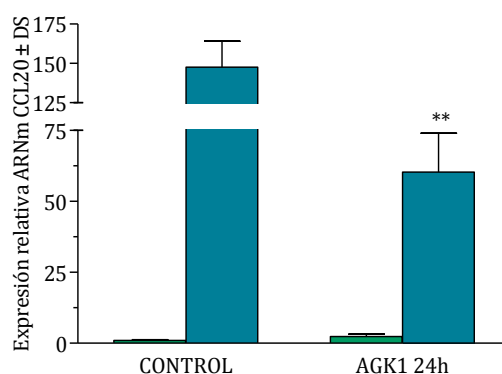


Se observó que la fracción no microbiana de kefir obtenida tanto con gránulos CIDCA AGK1 como CIDCA AGK10, por fermentación durante diferentes tiempos disminuyen la actividad

luciferasa, y por tanto la respuesta inflamatoria, inducida por flagelina en aproximadamente un 80 % (Figura 2.15). Además el tratamiento de las células con la fracción no microbiana no induce por sí misma una respuesta inflamatoria, ya que no se observan diferencias significativas en la actividad luciferasa de las células incubadas con fracción no microbiana y el control de células sin estimular.

## 2.2. Modulación de la expresión de ARNm de Ccl20 en células Caco-2/TC-7 por la fracción no microbiana de kefir

El efecto modulador de la respuesta inmune innata de la fracción no microbiana de kefir, fue verificado a nivel transcripcional mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Para ello las células Caco-2/TC-7 se incubaron con fracción no microbiana de kefir en DMEM base durante 30 min. Luego se estimularon con flagelina y se incubaron durante 2 h. A continuación se lisaron las células utilizando un buffer de lisis conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol y se extrajo el ARN total para proceder a la cuantificación de la expresión de ARNm de CCL20 como se detalló en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo. Los resultados se presentan en la Figura 2.16.



**Figura 2.16: Efecto de la preincubación con la fracción no microbiana de kefir en la expresión de ARNm de CCL20 en Caco-2/TC-7.** Fracción no microbiana obtenida por fermentación de leche con gránulos AGK1 24 h. (■) Condición sin estimular (■) Condición estimulada con flagelina. Los valores fueron expresados como relativos a la expresión de células que no recibieron ningún tratamiento. Los resultados corresponden al promedio de 2 experimentos independientes con triplicados  $\pm$  desvío estándar. Diferencias significativas \*\*  $p < 0,01$ , Test t Student, control estimulado con flagelina vs. fracción no microbiana elaborada con gránulos CIDCA AGK1 24 h estimulada con flagelina.

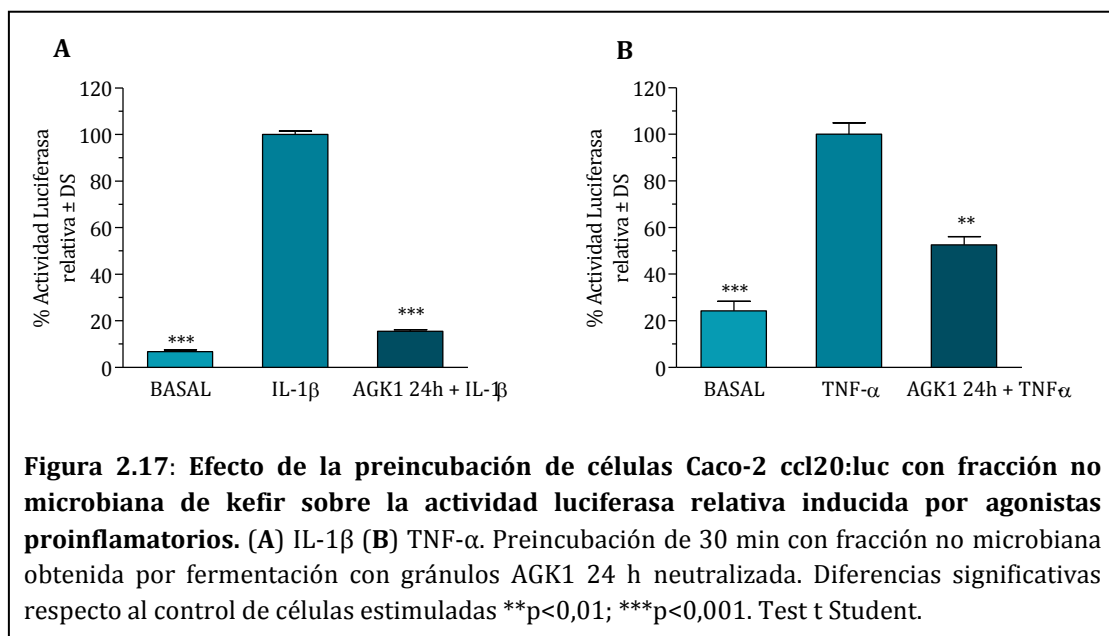
En las células que no recibieron tratamiento, se observó que la flagelina aumenta 150 veces la expresión del mensajero de CCL20 respecto a las células sin estimular. La preincubación del cultivo celular con fracción no microbiana de kefir disminuye significativamente el aumento de la expresión de CCL20 inducido por flagelina a nivel transcripcional respecto a las células sin tratamiento previo. Además se observó que la preincubación con fracción no microbiana de kefir no aumenta la expresión del mensajero de CCL20 por sí misma en la condición sin estímulo agregado.

### **2.3. Efecto de la fracción no microbiana de kefir frente a la estimulación del sistema Caco-2 ccl20:luc con IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$**

La IL-1  $\beta$  y el TNF- $\alpha$  son moléculas inflamatorias primarias que median muchas de las características locales y sistémicas de la inflamación. Son producidas principalmente por macrófagos en respuesta a una serie de estímulos, incluyendo varios productos microbianos, virus, complejos inmunes, células T activadas y la acción combinada de otras citoquinas tales como IL-2 e INF- $\gamma$ . Estas son reconocidas por receptores específicos de membrana que reclutan diversas moléculas de señalización que conducen a la activación de la vía NF- $\kappa$ B, tal como lo hace la flagelina a través del TLR5, con la consecuente producción de marcadores proinflamatorios.

A fin de analizar si las fracciones no bacterianas de kefir modulaban la inflamación inducida por otros agonistas de la respuesta inmune, generando diversas situaciones proinflamatorias en el entorno celular, se analizó el efecto de la preincubación durante 30 min con la fracción no microbiana de kefir (AGK1, 24 h) sobre la estimulación de la respuesta inmune de células Caco-2 ccl20:luc, con IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Figura 2.17).





Se observó que la fracción no microbiana de kefir disminuye significativamente la actividad luciferasa y por tanto, la transcripción de CCL20, independientemente de cuál sea el estímulo que induce la misma. Esto sugiere que el mecanismo por el cual este producto ejercería su efecto modulador sería independiente de la interacción entre TLR5 y flagelina. Los receptores TLR4 (receptor de LPS), TLR5 (de flagelina), así como el receptor de IL-1 $\beta$ , poseen un dominio tirosina kinasa y comparten gran parte de los efectores y segundos mensajeros en sus vías de transducción de señales.

Teniendo en cuenta que la fracción no microbiana de kefir presentó un efecto modulador de la respuesta inmune innata inducida tanto por flagelina, IL-1 $\beta$  como por TNF- $\alpha$  y que estos estímulos convergen en la activación de la vía NF- $\kappa$ B, podría pensarse que la fracción no microbiana de kefir altera en algún nivel esta vía de señalización, disminuyendo finalmente la producción de mediadores proinflamatorios.

### 3. Viabilidad celular luego del tratamiento de los cultivos celulares con la fracción no microbiana de kefir

Con el objetivo de verificar que la disminución de la actividad luciferasa en células estimuladas con flagelina pre-tratadas con la fracción no microbiana de kefir, respecto a las células sin tratamiento, no sea producida por daño celular se realizaron los siguientes controles de viabilidad celular luego de tratamientos.

### 3.1. Actividad de la enzima lactato deshidrogenasa

Para evaluar la integridad de las células luego de los tratamientos con la fracción no microbiana de leches fermentadas, se midió la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio extracelular. Esta enzima participa en el metabolismo energético anaerobio, cataliza la reacción reversible de conversión de lactato a piruvato utilizando  $\text{NAD}^+$  como cofactor. La enzima LDH se encuentra en el citoplasma celular por lo que un aumento de su concentración en líquidos extracelulares constituye un marcador de lesión en los tejidos. En los modelos *in vitro* de cultivos celulares, la liberación de LDH al medio extracelular es un indicador de daño. La actividad LDH se expresó como la variación de  $A_{340\text{nm}}$  por minuto (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2:** Actividad LDH expresada como variación de  $A_{340\text{nm}}$  en el tiempo.

Tratamiento	$\Delta A_{340\text{nm}} / \text{min}$	
	Lisado celular (Actividad LDH total)	Sobrenadante de cultivo
Control	$0,35 \pm 0,07^a$	$0,0037 \pm 0,00051^b$
Flagelina	$0,33 \pm 0,04^a$	$0,0031 \pm 0,0063^b$
FNMK AGK1 24h	$0,32 \pm 0,05^a$	$0,0033 \pm 0,0008^b$
FNMK AGK1 48h	$0,29 \pm 0,02^a$	$0,0009 \pm 0,0007^b$
FNMK AGK10 24h	$0,31 \pm 0,12^a$	$0,0003 \pm 0,0005^b$
FNMK AGK10 48h	$0,35 \pm 0,10^a$	$0,00010 \pm 0,0005^b$

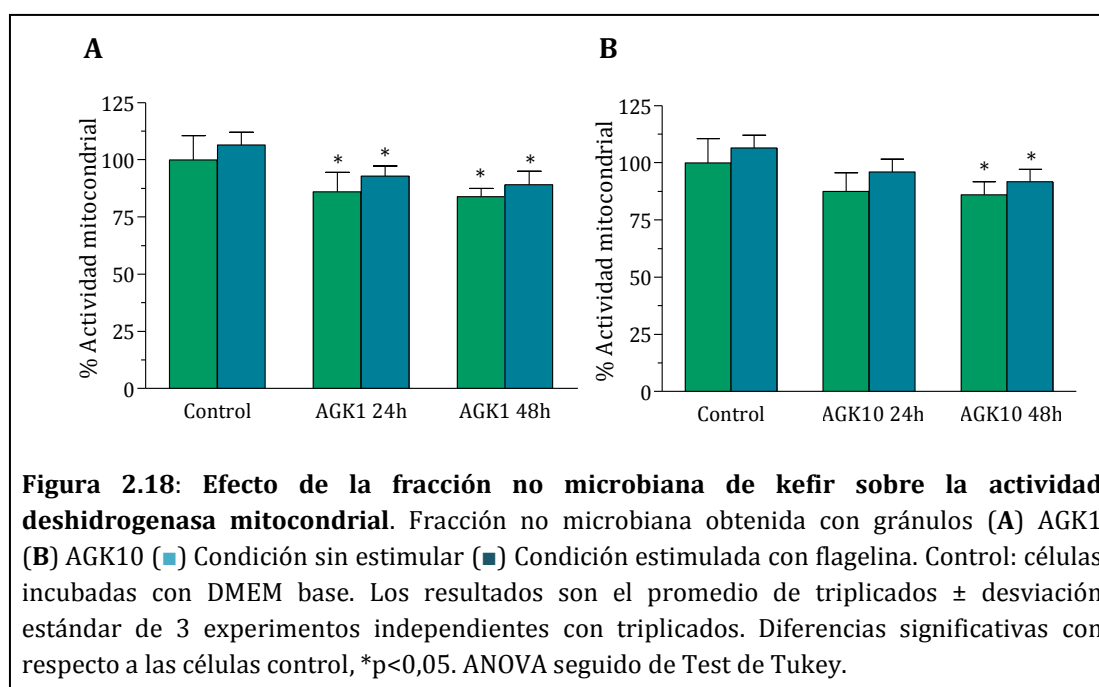
FNMK: Fracción no microbiana de kefir. Distintos superíndices indican diferencias significativas con un valor  $\alpha=0,05$ . ANOVA seguido de Test de Tukey.

La actividad enzimática en el medio de cultivo de células que no recibieron tratamiento fue nula (indicando integridad celular), mientras que en el lisado celular la actividad LDH fue la máxima evidenciada. Luego de la incubación de las células con flagelina o incubadas con la fracción no microbiana de kefir, tampoco se detectó actividad de la enzima LDH en el sobrenadante de cultivo de células. Por lo tanto, con estos resultados se pudo inferir que la incubación de las células con la fracción no microbiana de kefir no afecta las membranas celulares y por lo tanto, la disminución de la actividad luciferasa inducida por flagelina en células tratadas con la fracción no microbiana de kefir, no se debe a que las células hubieran sido dañadas.

### 3.2. Actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial

A través de la determinación de la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial se evaluó si los sobrenadantes de leche fermentadas ejercían algún efecto citotóxico que afecte la respuesta celular. Luego de la incubación de las células Caco-2 ccl20:luc con la fracción no microbiana de kefir, tal como se procedió para los ensayos de inmunomodulación, se evaluó la actividad enzimática mitocondrial como se describió en la sección Materiales y Métodos del presente Capítulo.

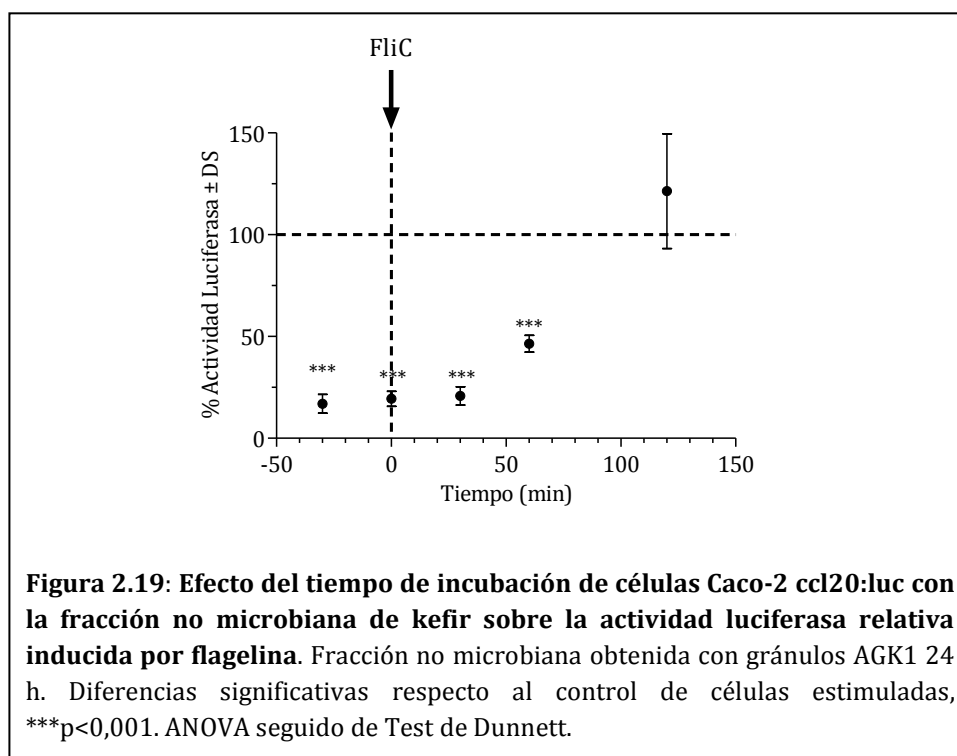
En la Figura 2.18 puede observarse la actividad mitocondrial de las células luego de los tratamientos con la fracción no microbiana de leche fermentada con gránulos AGK1 y AGK10 durante 24 y 48 h.



El aumento del formazan producido por la reducción de la sal por las enzimas mitocondriales, produce un aumento de la  $A_{450nm}$  y este valor es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo. Si bien la actividad deshidrogenasa de los cultivos tratados con la fracción no microbiana de kefir fue significativamente diferente a la de los controles, se mantuvo el 87 % de la actividad enzimática. De este modo, se confirmó que el efecto observado acerca de la capacidad de la fracción no microbiana de kefir de disminuir la actividad luciferasa inducida por flagelina no se debe a la pérdida de viabilidad celular sino a la disminución de producción de la citoquina CCL20.

#### 4. Efecto del tiempo de preincubación con la fracción no microbiana de kefir en la modulación de la respuesta inflamatoria

Para evaluar si el efecto de la fracción no microbiana de kefir sobre la modulación de la respuesta inflamatoria inducida por flagelina requería adaptación de la célula o actuaba después de agregado el estímulo inflamatorio, se evaluó el efecto del tiempo de preincubación de las células epiteliales con los distintos sobrenadantes frente a la estimulación con flagelina. En estos ensayos se incubaron las células Caco-2 ccl20:luc con la fracción no microbiana de kefir obtenida con gránulos CIDCA AGK1 durante 24 h, en las siguientes condiciones: 30 min antes, en simultáneo y 30, 60 o 120 min después de la estimulación con flagelina (tiempo cero). Los resultados se muestran en la Figura 2.19.



A partir de estos ensayos se observó que la fracción no microbiana de kefir posee la capacidad de modular la respuesta inmune innata incluso si se enfrenta a las células epiteliales hasta una hora después de la estimulación con flagelina. Sin embargo su acción resultó más efectiva si el contacto con las células epiteliales se realizaba de manera anticipada, en simultáneo o hasta 30 min luego de la estimulación con el agonista proinflamatorio.

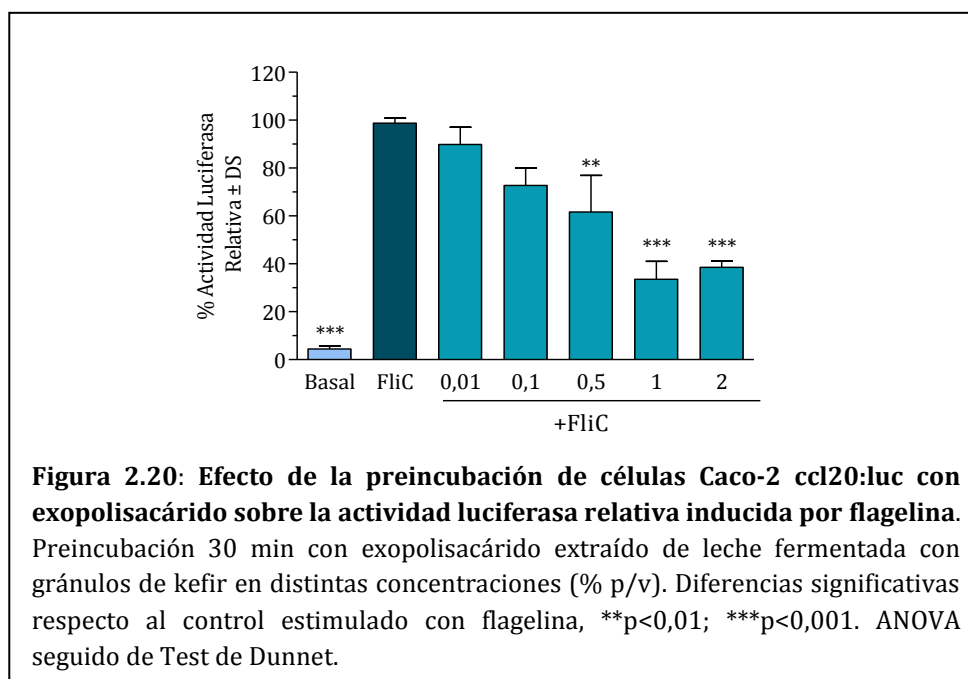
Los resultados presentados hasta el momento permitieron demostrar la participación de la fracción no microbiana de kefir en la modulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias. Vinderola y col. (2005; 2006a; 2006b) demostraron que tanto el kefir, como el kefir pasteurizado, fueron capaces de modular el sistema inmune de la mucosa intestinal en ratones, de manera dosis-dependiente y observaron que favorecen el mantenimiento de la homeostasis intestinal y aumentan la producción de IgA, a nivel de intestino delgado y grueso. También describieron que la fracción no microbiana de kefir incide sobre la secreción de citoquinas por células de sistema inmune innato. Por lo que puede observarse que tanto en el kefir completo como la fracción no microbiana contienen componentes que podrían tener un rol como sustancias bioterapéuticas orales. Otros autores han descripto que ciertas cepas de lactobacilos, principalmente *Lactobacillus helveticus* que posee alta capacidad proteolítica, pueden liberar péptidos de las proteínas lácteas durante la fermentación que podrían contribuir a la actividad inmunomoduladora del producto fermentado obtenido con ellas (LeBlanc y col., 2002, Vinderola y col., 2007, Tellez y col., 2011, Elfahri y col., 2014). Si bien muchos autores han descripto la actividad biológica de leches fermentadas con bacterias probióticas y sus metabolitos, no en todos los casos han podido dilucidar cuáles serían los componentes responsables de los efectos observados.

## **5. Efecto de componentes aislados de la fracción no microbiana de kefir en la modulación de la respuesta inmune innata epitelial**

La actividad biológica de la fracción no microbiana de kefir podría ser conferida por los metabolitos liberados durante la fermentación. En el Capítulo 1 se determinó que los principales productos metabólicos presentes en la fracción no microbiana de kefir son los ácidos orgánicos, exopolisacáridos y también péptidos derivados de la hidrólisis de proteínas, además en esta fracción aún permanecen los componentes solubles a pH 4 de la leche. Con el objetivo de aproximarnos a la naturaleza de la sustancia responsable de la capacidad de modular la respuesta inmune innata epitelial de la fracción no microbiana de kefir, realizamos ensayos sobre el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc utilizando componentes aislados y también analizamos el efecto del tratamiento térmico y la diálisis sobre la capacidad moduladora.

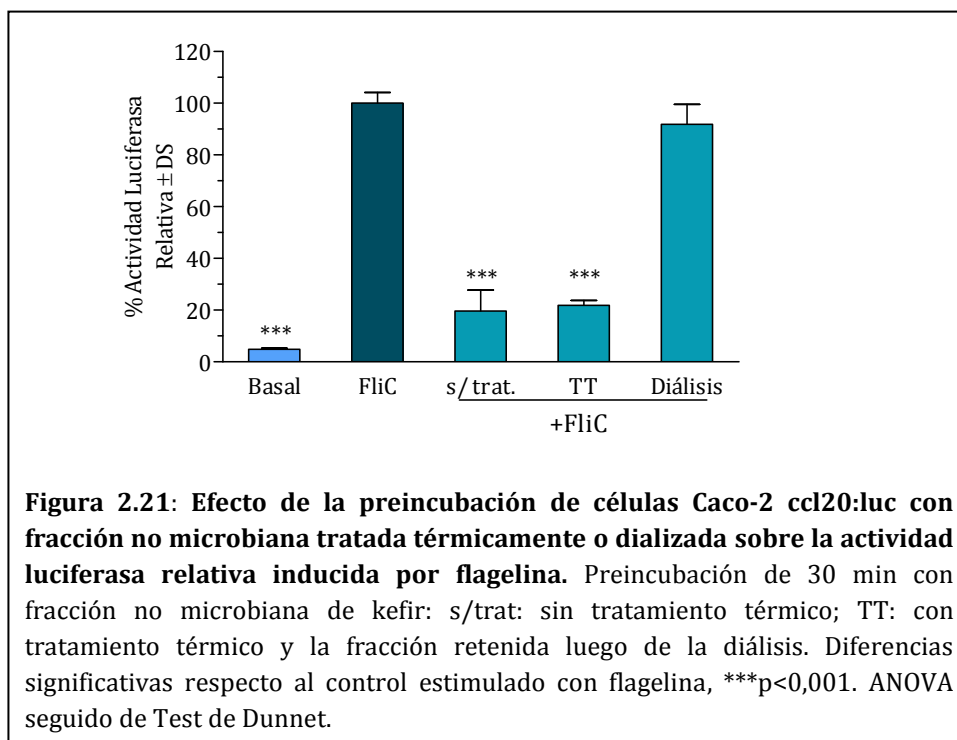
Debido a la evidencia de la capacidad inmunomoduladora de polisacáridos producidos por bacterias lácticas, en primer lugar se analizó como posible metabolito responsable del efecto observado, el exopolisacárido presente en la fracción no microbiana de kefir, en forma

aislada. Para ello, se pre-incubaron las células con diferentes concentraciones de kefirán durante 30 min y luego se estimularon con flagelina (Figura 2.20).



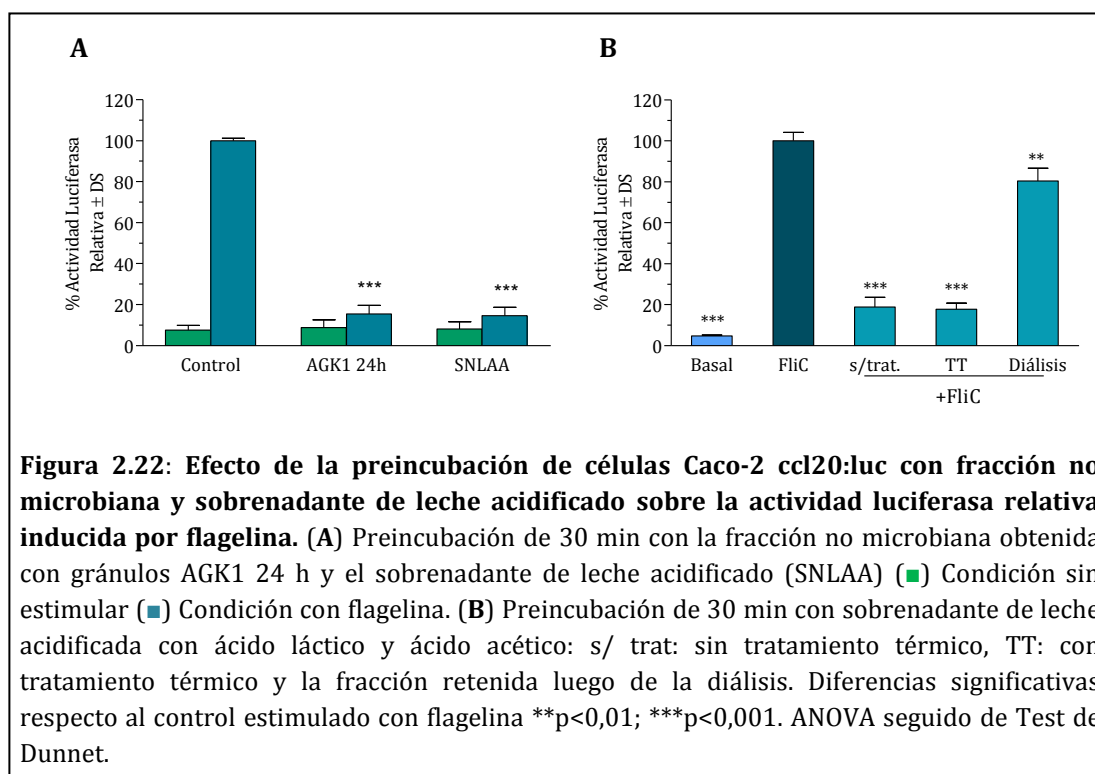
Como se puede ver en la Figura 2.20, el exopolisacárido extraído de la leche fermentada presentó capacidad de modular la respuesta inflamatoria inducida por flagelina en el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc. Sin embargo, en las concentraciones en que este polisacárido se encuentra en la fracción no microbiana de kefir (aproximadamente 0,02 % p/v) no presentó dicha actividad. En estos ensayos también se comprobó la integridad del cultivo celular luego del tratamiento con kefirán, medida de la actividad LDH en el medio de cultivo respecto a la actividad obtenida en el lisado celular total. De este modo se verificó que la incubación de las células con kefirán no afectó la integridad celular.

Debido al interés por identificar la naturaleza de los componentes bioactivos se analizó el efecto inmunomodulador de la fracción no microbiana de kefir luego de ser sometidos a un tratamiento térmico (15 min a 100 °C) y a una diálisis con una membrana de tamaño de corte de 1000 Da (Figura 2.21).



En la Figura 2.21 se observa que la fracción no microbiana de kefir, presentó un efecto modulador de la respuesta inmune innata significativo, aún cuando ha sido tratada térmicamente (15 min a 100 °C). Sin embargo, cuando fue dializada, perdió la capacidad de modular la respuesta inflamatoria en el sistema reportero de estudio. Este resultado indica que el metabolito responsable del efecto observado no es sensible al tratamiento térmico y tendría un peso molecular inferior a 1000 Da.

Teniendo en cuenta estos resultados se analizó el efecto inmunomodulador de un sobrenadante de leche acidificada artificialmente con ácido láctico y ácido acético en las concentraciones encontradas en la fracción no microbiana de kefir (Figura 2.22 A), así como también luego de ser sometidos a un tratamiento térmico (15 min a 100 °C) y a una diálisis con una membrana de tamaño de corte de 1000 Da (Figura 2.22 B)



Como se observa en la Figura 2.22 A, el sobrenadante de leche acidificado artificialmente con ácido láctico y ácido acético presentó una capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial equivalente a la de la fracción no microbiana de kefir. Además mediante medida de actividad LDH se verificó que la incubación de las células con el sobrenadante de leche artificialmente acidificado no produce un daño celular.

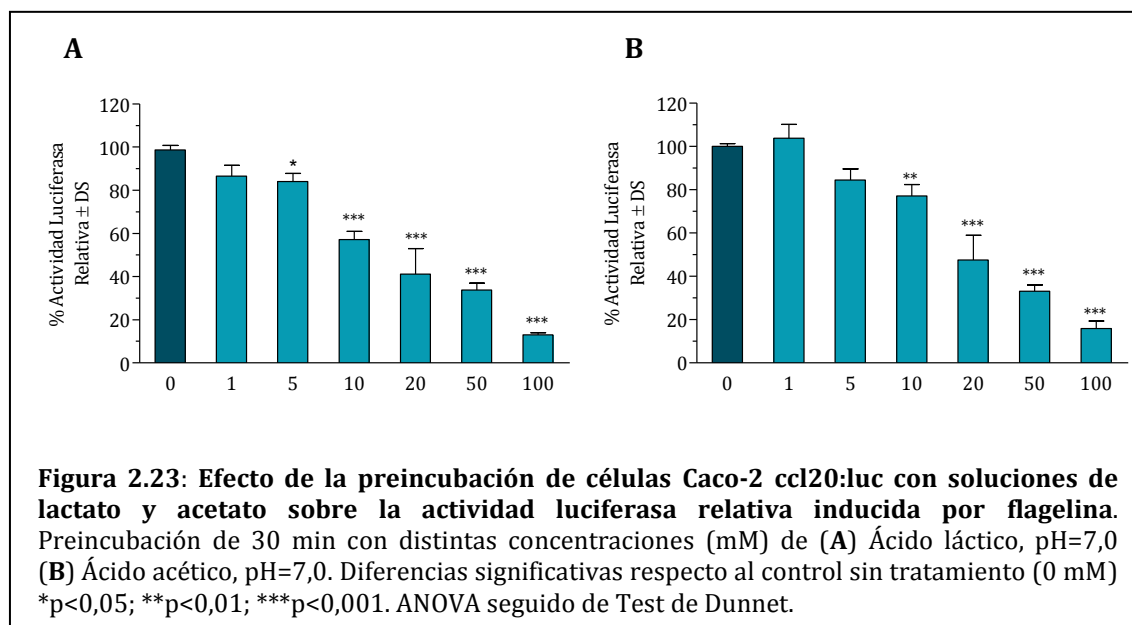
En la Figura 2.22 B, se observa que, el sobrenadante de leche acidificada artificialmente con ácido láctico y acético, presentó un efecto modulador de la respuesta inmune innata significativo, aún cuando fue tratado térmicamente (15 min a 100 °C) y perdió parcialmente la capacidad de modular la respuesta inflamatoria en el sistema reportero al ser dializado.

El efecto del sobrenadante de leche acidificada artificialmente con ácidos orgánicos resultó particularmente de interés ya que este producto contiene todos los componentes solubles de la leche a pH ácido, mientras que no habría contribución de productos metabólicos bacterianos más que los ácidos orgánicos agregados.

Estos resultados indicarían que el/los metabolitos responsables del efecto observado de peso molecular inferior a 1000 Da y resistentes al tratamiento térmico serían los ácidos láctico y acético presentes en la leche fermentada, o al menos podemos afirmar que estarían involucrados en forma directa en el efecto observado.

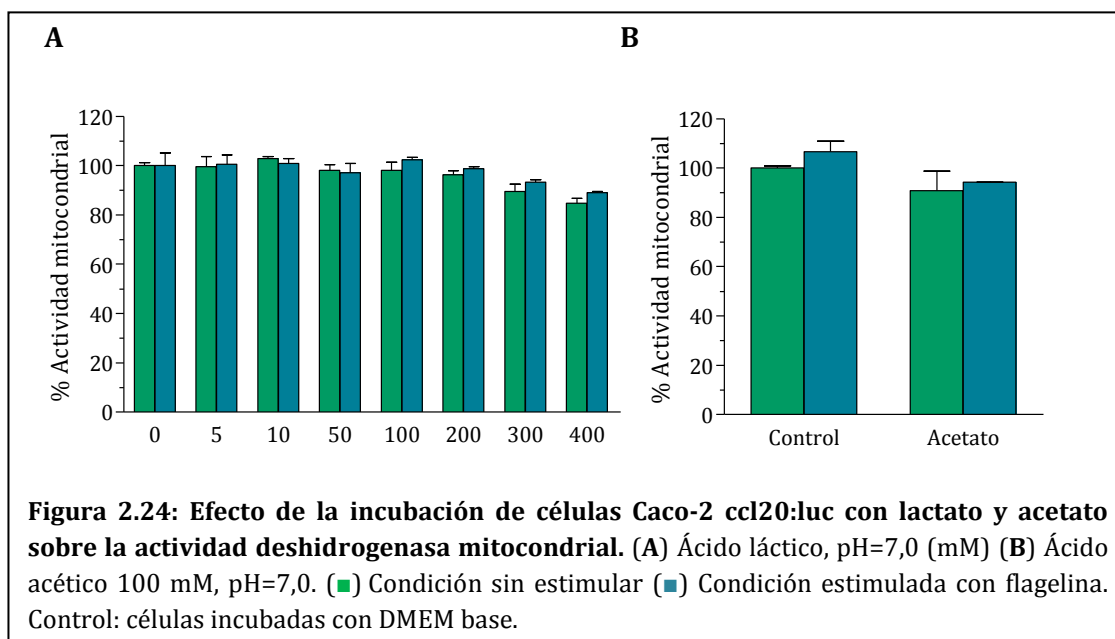


Para confirmar esta hipótesis se realizaron ensayos con soluciones acuosas de diferentes concentraciones de estos ácidos, que se neutralizaron y esterilizaron por filtración sobre la actividad luciferasa inducida por flagelina en células Caco-2 ccl20:luc (Figura 2.23).



Se observó que ambos ácidos orgánicos modulan la activación de la respuesta inmune innata inducida por flagelina, cuando se ponen en contacto con las células epiteliales en concentraciones mayores o iguales a 5 mM o 10 mM para el ácido láctico y acético respectivamente. Dado que la concentración de ácido acético hallada en la fracción no microbiana de kefir tuvo un valor máximo de 12 mM, la contribución de este metabolito al efecto bioactivo sería menor; otorgándole al ácido láctico el rol de principal responsable del efecto observado ya que en kefir su concentración varía entre 90-150 mM.

La viabilidad de las células luego del tratamiento con diferentes concentraciones de lactato y acetato se determinó mediante la medida de la actividad deshidrogenasa mitocondrial.

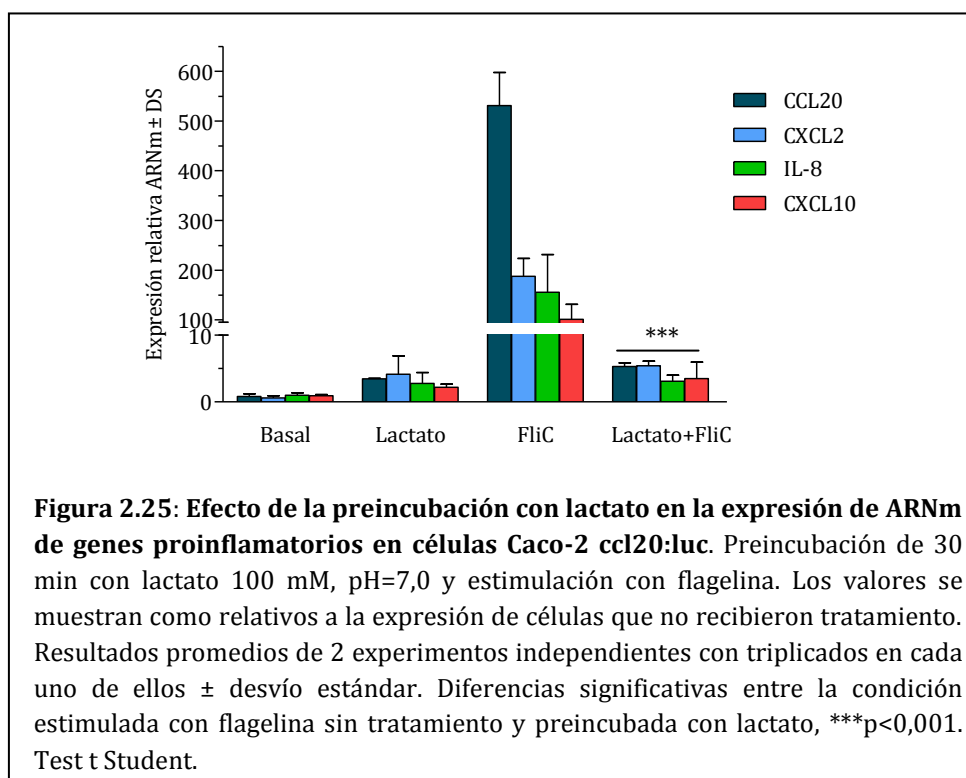


Como puede verse en la Figura 2.24, la incubación con lactato aún en concentraciones elevadas (superiores a 100 mM) y acetato 100 mM, no resultó citotóxico y no disminuyó significativamente la viabilidad celular con respecto a las células que no recibieron ningún tratamiento.

El ácido láctico constituye uno de los componentes principales de los productos lácteos fermentados, contribuyendo a las propiedades organolépticas y antimicrobianas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el lactato podría contribuir a las propiedades inmunomoduladoras atribuidas a estos productos.

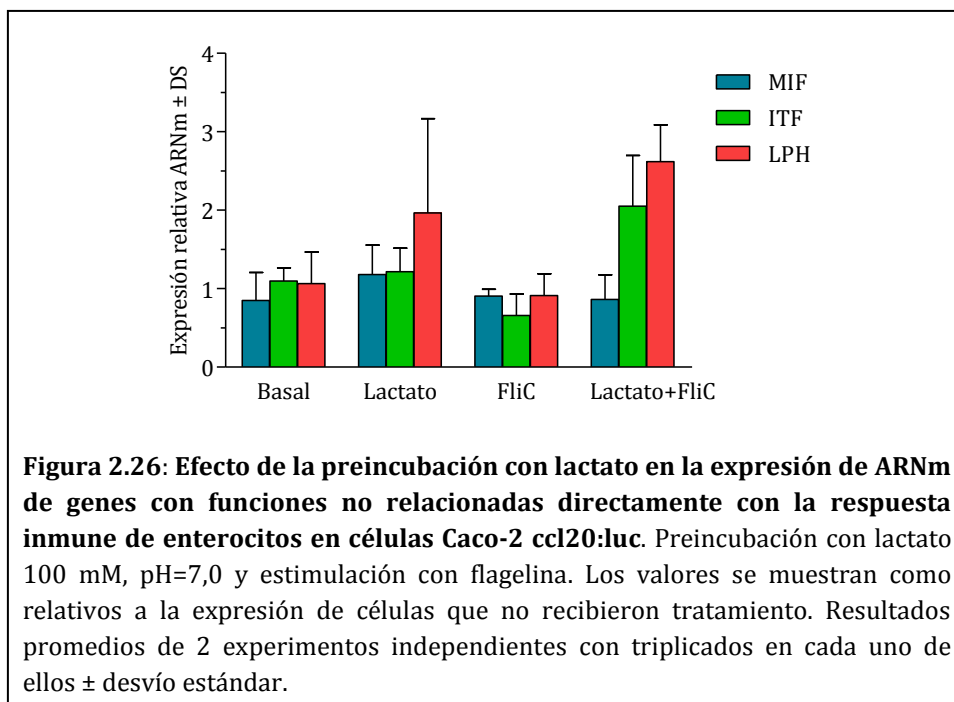
## 6. Modulación de la expresión génica en células Caco-2 ccl20:luc por lactato

A fin de confirmar los resultados obtenidos en el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc, se evaluó el efecto de la activación de las células con flagelina y la preincubación con lactato mediante la medida de los niveles de ARNm de citoquinas proinflamatorias. Se evaluó CCL20 y además se analizó la expresión de CXCL2, quimioattractante de neutrófilos y monocitos; CXCL8 conocida también como IL-8, quimioattractante de neutrófilos y CXCL10, quimioattractante de linfocitos T efectores (Figura 2.25).



Se observó que la expresión de los ARNm de las quimoquinas CCL20, CXCL2, IL-8 y CXCL10 aumentó al menos 100 veces con respecto a la condición basal por la estimulación con flagelina y en el caso de CCL20 hasta 500 veces. Esta respuesta disminuyó significativamente cuando las células epiteliales fueron preincubadas 30 min con solución de lactato 100 mM, pH 7,0.

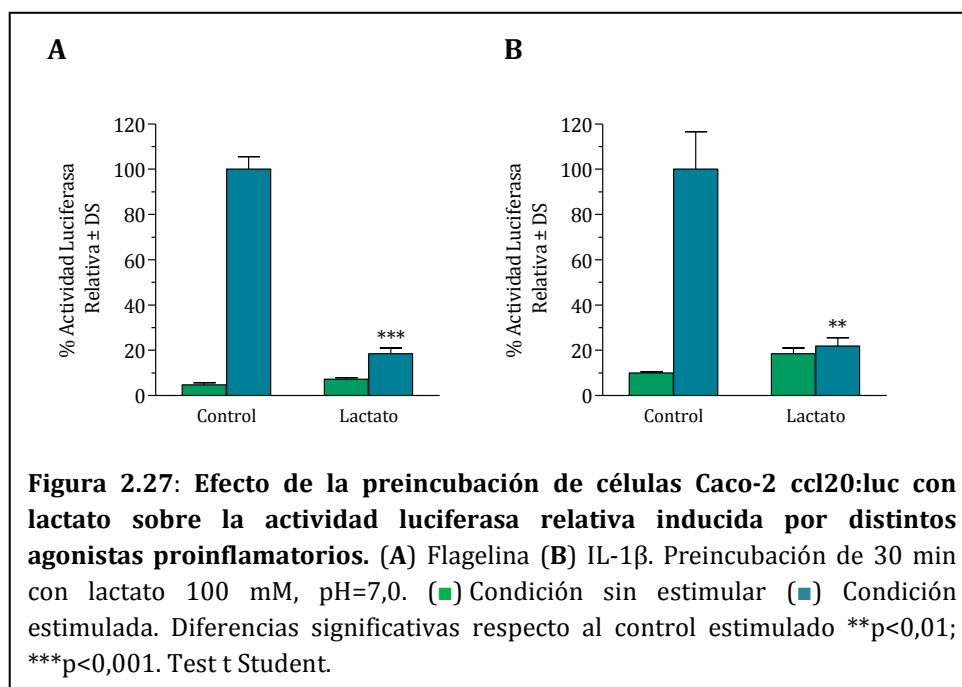
Del mismo modo se evaluó el efecto de la preincubación de las células epiteliales con lactato 100 mM sobre la expresión de genes con funciones no inmunológicas, expresados en enterocitos. Los genes seleccionados para este ensayo fueron: LPH (*Lactase Phlorizin Hydrolase*), una enzima involucrada en la función digestiva de los enterocitos; ITF (*Intestinal Trefoil Factor*), que participa en la reparación del epitelio intestinal y MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*), una quimoquina constitutiva (Figura 2.26).



Como se observa en la Figura 2.26, la expresión de ninguno de los genes constitutivos se vio modificada de manera significativa ya sea por efecto de la preincubación de las células epiteliales con lactato, la estimulación con flagelina o la combinación de ambas. En ningún caso se observaron cambios en los niveles de expresión de  $\beta$ -actina, el gen utilizado como referencia.

Puede decirse entonces que el lactato disminuyó la actividad luciferasa inducida por flagelina, así como también disminuyó la expresión del mensajero de CCL20 respecto a las células que no recibieron tratamiento, indicando su efecto a nivel traduccional y transcripcional. Asimismo también afectó la transcripción de otros genes de citoquinas proinflamatorias, mientras que no alteró la expresión de genes relacionados con el normal funcionamiento de los enterocitos.

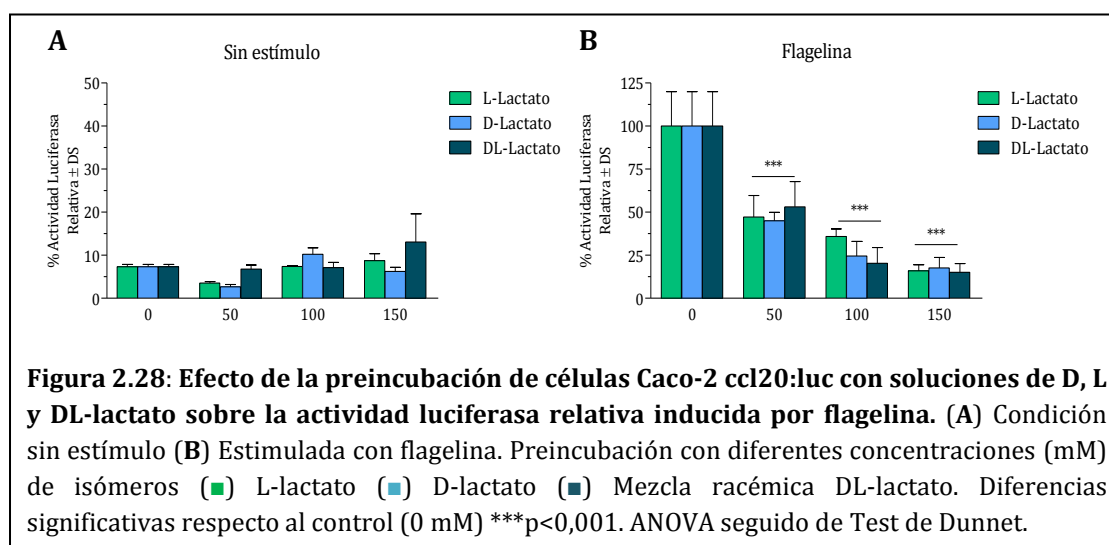
A continuación se analizó el efecto de la preincubación con lactato 100 mM frente a la estimulación de células Caco-2 ccl20:luc tanto por flagelina como por IL-1 $\beta$ . Los resultados se presentan en la Figura 2.27.



Se pudo observar que la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial que ejerce el lactato fue independiente del estímulo proinflamatorio utilizado (flagelina o IL-1 $\beta$ ), tal como se había observado para la fracción no microbiana de kefir.

## 7. Efecto de la isomería

Para evaluar si el efecto observado dependía de la isomería del lactato, se analizó el efecto de la preincubación 30 min de células Caco-2 ccl20:luc con los isómeros D-lactato, L-lactato y la mezcla racémica DL-lactato frente a la estimulación con flagelina.



Tanto los isómero D(+) como L(-) lactato presentaron un efecto modulador de la respuesta inflamatoria inducida por flagelina en los enterocitos que resultó equivalente al de la mezcla racémica, indicando que el efecto inmunomodulador del lactato es independiente de la isomería.

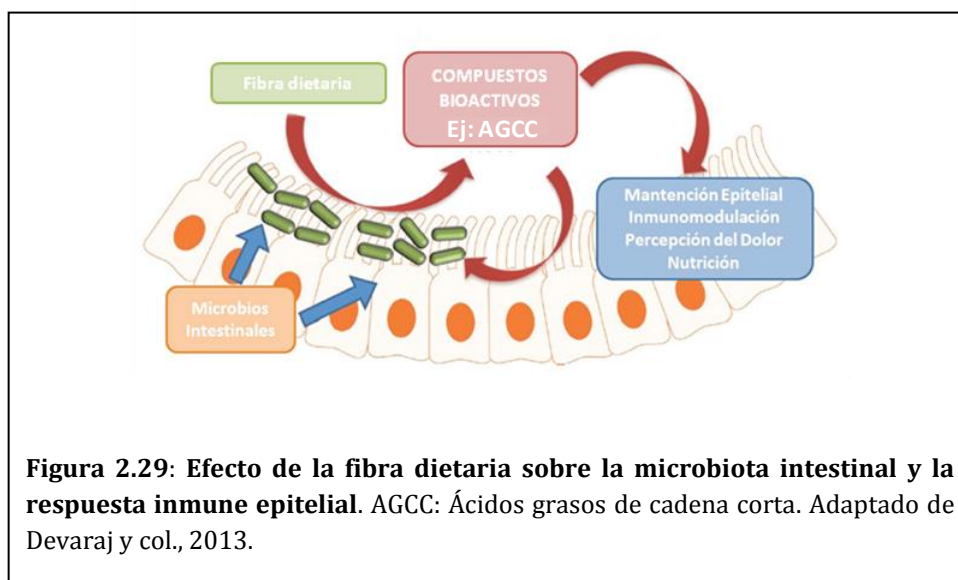
Los resultados presentados hasta el momento permitieron demostrar la relevancia del lactato en la modulación de respuesta inmune innata epitelial ejercida por la fracción no microbiana de kefir. Muchos estudios reportan la bioactividad de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos en el colon como resultado de la fermentación anaeróbica de la microbiota (Roy y col., 2006; Tedelind y col., 2007; Vinolo y col., 2011a y 2011b; Arpaia y col., 2013; Macia y col., 2015; Wang y col., 2015), mientras que el efecto del lactato como metabolito inmunomodulador ha sido menos estudiado.

El kefir contiene uno de los niveles más altos de lactato, probablemente como resultado de la acción combinada del consorcio microbiano del gránulo (Garrote y col., 2010). Dado que las propiedades inmunomoduladoras de diferentes fracciones del kefir se han demostrado *in vivo* (Vinderola y col., 2006b; Vinderola y col., 2007) es posible pensar que algunas de las propiedades inmunomoduladoras asociadas al consumo de kefir puedan estar relacionadas con los niveles particularmente altos de lactato que se encuentran en esta leche fermentada o a la producción *in situ* de lactato por los microorganismos. De acuerdo con el perfil dosis-respuesta, se observó que el lactato modula la activación de la respuesta innata en concentraciones superiores a 50 mM, la cual está dentro de los niveles que se producen en el kefir. Dado que el ácido láctico se puede encontrar en otros alimentos fermentados a niveles de aproximadamente 5 a 100 mM (Fernández Villamil y col., 1997), es posible que otros productos fermentados también sean capaces de ejercer la actividad biológica que se muestra aquí en diferentes grados.

## **8. Modulación de la respuesta inflamatoria intestinal *in vitro* por metabolitos de fermentación microbiana**

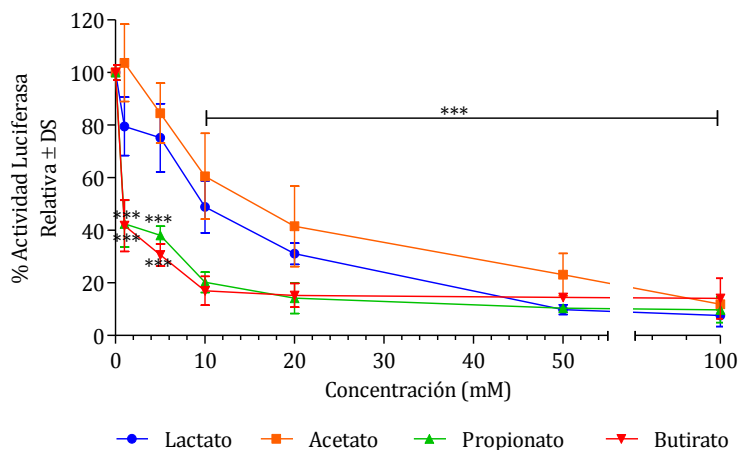
Las fibras dietéticas son carbohidratos complejos que los seres humanos son incapaces de metabolizar, debido a que carecen de las enzimas adecuadas. Sin embargo, la microbiota presente en el intestino puede utilizar estas sustancias como fuente de energía, fermentarlos y producir AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato (Macfarlane & Macfarlane, 2003). Además de su importante papel como combustible para las células epiteliales intestinales, los AGCC están implicados en diferentes procesos en el tracto gastrointestinal

como la absorción de agua y electrolitos (Vinolo y col., 2011a). También contribuyen a la homeostasis del organismo (Arpaia y col., 2013; Smith y col., 2013; De Vadder y col., 2014) y se ha demostrado que poseen propiedades antiinflamatorias sistémicas (Maslowski y col., 2009) (Figura 2.29).



Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que tanto el acetato como el lactato poseen actividad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial *in vitro* de manera dosis-dependiente. Dada la evidencia de que los AGCC pueden modular la respuesta inmune, a través de diversos mecanismos, se consideró valioso explorar también efecto del propionato y butirato en el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc.

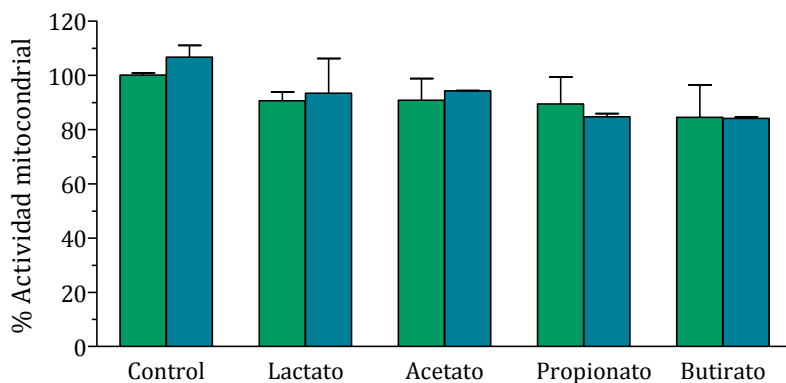
Se llevaron a cabo ensayos sobre cultivo de células Caco-2 ccl20:luc, las cuales fueron preincubadas 30 min con soluciones de acetato, lactato, propionato y butirato en concentraciones de 1 a 100 mM. Para ello, las soluciones acuosas de los ácidos fueron neutralizadas y esterilizadas por filtración. Se determinó la actividad luciferasa mediante la medida de luminiscencia. Los valores se normalizaron respecto a un control estimulado con flagelina que no recibió ningún tratamiento (Figura 2.30).



**Figura 2.30: Efecto de la preincubación de células Caco-2 ccl20:luc con soluciones de ácidos orgánicos sobre la actividad luciferasa relativa inducida por flagelina.** Preincubación de 30 min con distintas concentraciones de ácidos orgánicos, pH=7,0 (●) ácido láctico (■) ácido acético (▲) ácido propiónico (▼) ácido butírico. Diferencias significativas respecto al control estimulado con FliC, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . ANOVA seguido de Test de Dunnett.

Tal como había sido observado para el lactato y el acetato, se obtuvo un efecto modulador de la respuesta inmune innata epitelial dosis dependiente para el propionato y butirato aún en concentración 1 mM.

Se controló la viabilidad celular de los cultivos incubados con los diferentes ácidos, mediante la determinación de la actividad enzimática mitocondrial. Los resultados se presentan en la Figura 2.31.

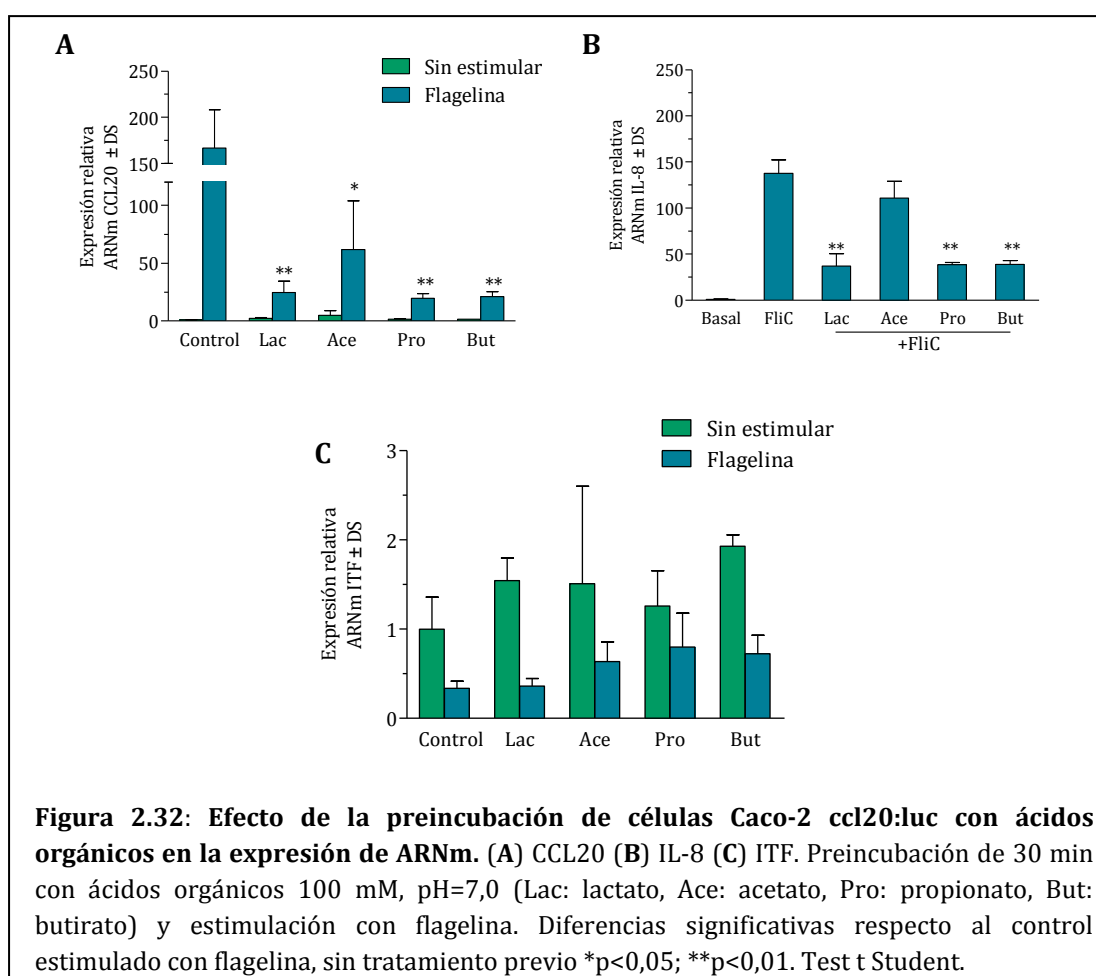


**Figura 2.31: Efecto de la incubación de células Caco-2 ccl20:luc con ácidos orgánicos sobre la actividad deshidrogenasa mitocondrial.** Incubación 5 h con soluciones de ácidos orgánicos 100 mM, pH=7,0. (■) Condición sin estimular (■) Condición estimulada con flagelina.



Se confirmó que la incubación de células Caco-2 ccl20:luc con los AGCC no afectó la viabilidad celular, por lo cual se descartó la posibilidad de que la disminución de la activación de la respuesta inmune innata, determinada mediante la actividad luciferasa inducida por flagelina en el sistema de células Caco-2 ccl20:luc, fuera generada por un efecto citotóxico.

El efecto de los AGCC fue analizado también a nivel transcripcional mediante la determinación de ARNm de citoquinas proinflamatorias: CCL20 e IL-8 y a modo de control se analizó el efecto sobre la expresión del gen constitutivo ITF (Figura 2.32).



En la Figura 2.32 se observa el efecto de los ácidos orgánicos en concentración 100 mM a nivel transcripcional. En estos ensayos se observó que el tratamiento de las células con los distintos ácidos no induce la expresión de mensajeros de las citoquinas proinflamatorias CCL20 ni de IL-8. Al estimular las células con flagelina se produce un aumento significativo de la expresión de estos genes, siendo este aumento menor en las células que fueron pretratadas con lactato, propionato y butirato. En el caso particular del acetato, se observó

una modulación significativa de la expresión de ARNm de CCL20 respecto a las células sin tratamiento, ambos estimulados con flagelina, mientras que la modulación de la expresión de IL-8 no fue significativa. Por último, se midió el efecto del tratamiento de las células sobre la expresión de ARNm del gen que codifica para la proteína ITF y se observó que los niveles de expresión en las células pretratadas con los AGCC no fueron significativamente diferentes de la expresión en células sin tratamiento.

## CONCLUSIONES

### A. Actividad antimicrobiana de la fracción no microbiana de kefir

- La fracción no microbiana de kefir adicionado en concentraciones superiores a 75 % v/v inhibió el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli*, *Salmonella* y *B. cereus* en caldo nutritivo.
- La fracción no microbiana de kefir concentrada 5 veces y neutralizada no inhibió el desarrollo de las cepas patógenas estudiadas.
- La capacidad inhibitoria observada se relacionó con la concentración de ácido láctico no disociado ya que los productos perdieron dicha actividad al ser neutralizados.
- La preincubación de células epiteliales con la fracción no microbiana de kefir no modificó la asociación/invasión de *Salmonella*.
- La preincubación de *Salmonella* con la fracción no microbiana de kefir disminuyó significativamente la capacidad de *Salmonella* de invadir células epiteliales.

### B. Actividad inmunomoduladora de la fracción no microbiana de kefir

- La fracción no microbiana de kefir obtenida luego de 24 y 48 h de fermentación a 20 °C, con los dos los gránulos CIDCA AGK1 y AGK10, mostró la capacidad de modular la respuesta inmune innata epitelial *in vitro* inducida por flagelina, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .
- La fracción no microbiana de kefir disminuyó la expresión de ARNm de CCL20 inducida por flagelina.
- El polisacárido aislado de leche fermentada con gránulos de kefir, moduló la respuesta inmune innata epitelial inducida por flagelina en concentraciones mayores a 1 % p/v.

- El/los metabolito responsable de la actividad inmunomoduladora de la fracción no microbiana presentó un peso molecular menor a 1000 Da y resistió el tratamiento térmico (15 min, 100 °C).
- El lactato y el acetato modularon la respuesta inmune innata epitelial inducida por flagelina *in vitro* en forma dosis-dependiente. Además, tanto el isómero D-, como el L-lactato y la mezcla racémica presentaron un efecto inmunomodulador equivalente.
- El pretratamiento de células con lactato 100 mM, disminuyó la inducción de la expresión de quimoquinas proinflamatorias CCL20, IL-8, CXCL2 y CXCL10 ante la estimulación con flagelina, sin afectar la expresión de genes relacionados con el normal funcionamiento de los enterocitos (ITF, LPH, MIF).
- Otros productos de fermentación microbiana como el propionato y butirato, también modularon la respuesta inmune innata epitelial en ensayos *in vitro* de manera dosis-dependiente y en concentraciones menores que el lactato y acetato.
- Los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) disminuyeron la expresión de ARNm de CCL20, propionato y butirato también disminuyeron la expresión de ARNm de IL-8, en células epiteliales estimuladas con flagelina, mientras que no indujeron cambios en la expresión de genes implicados en el normal funcionamiento de los enterocitos.

# Capítulo 3

---

Efecto del lactato en un modelo murino  
de inflamación intestinal

## INTRODUCCIÓN

### 1. Enfermedades inflamatorias intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) son un grupo de patologías que incluye como principales exponentes a la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). No se conoce con exactitud la etiología de estas enfermedades, participando en las mismas factores genéticos, ambientales e inmunológicos (Jurjus y col., 2004). Estas enfermedades constituyen un trastorno gastrointestinal común y crónico caracterizado por una disfunción, inflamación y daño del tejido de la mucosa intestinal iniciado y perpetuado por una respuesta inmune mal regulada (Kleessen y col., 2002; McGuckin y col., 2009). Ambas formas pueden asociarse con manifestaciones extraintestinales como fiebre, pérdida de peso, retraso en el crecimiento, artralgias o artritis, lesiones mucocutáneas y una mayor incidencia de cáncer gastrointestinal (Ekbom y col., 1990). Comúnmente se presentan en individuos jóvenes o adultos y persisten durante largos períodos, afectando la calidad de vida y aumentando la mortalidad a causa de esta enfermedad. En pacientes con EC, la inflamación suele ser localizada en el íleon y el colon; sin embargo, en algunos individuos, puede implicar cualquier parte del tracto gastrointestinal. La inflamación es discontinua y transmural, y se caracteriza por la presencia de grandes números de células mieloides, así como células T efectoras diferenciadas hacia una respuesta tipo Th1 y Th17 en el intestino. La inflamación asociada a la CU está, por definición, restringida al colon donde el infiltrado se manifiesta en la mucosa del intestino grueso. Se cree que la falta de una regulación apropiada de la respuesta inmune a las bacterias entéricas induce la sobreproducción sostenida de las múltiples citoquinas inflamatorias, especies reactivas del oxígeno y especies de nitrógeno que pueden dañar directa o indirectamente tejido intestinal y conducen a erosiones, ulceraciones, fibrosis, y edema. En condiciones normales, la actividad inflamatoria está regulada por el balance de citoquinas producidas por los linfocitos T de la lámina propia con actividad proinflamatoria y moléculas antiinflamatorias (Strober y col., 1997). En general, cuando se estudian las biopsias completas de intestinos de pacientes con EII, se encuentra un aumento en la expresión basal de citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18 y los miembros de la familia del IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27), entre otros (Autschbach y col., 2002). Además también aumentan sus oponentes

antiinflamatorios: TGF- $\beta$  e IL-10, y el equilibrio entre ambos grupos es lo que finalmente determina el curso de la enfermedad (Autschbach y col., 2002). Los tratamientos actuales para las EII se limitan al uso de anti-inflamatorios, inmunosupresores y antibióticos, que tienen el objetivo de controlar el desarrollo de la inflamación o bloquear las vías de señalización que se cree están involucradas en la respuesta inmune excesiva asociada con la enfermedad activa. Sin embargo, estos fármacos están asociados con efectos adversos graves tales como reacciones alérgicas, problemas hepáticos (Marteau, 2006; Nielsen & Munck, 2007) y su efecto terapéutico puede ser limitado. En casos severos se recurre a resecciones quirúrgicas de los segmentos afectados, siendo frecuente las recidivas post-operatorias. Debido a esto muchas investigaciones de los últimos años se centran en el desarrollo nuevas estrategias para el tratamiento de este tipo de afecciones.

## 2. Modelos experimentales de enfermedad inflamatoria intestinal

Un modelo animal adecuado para el estudio de EII debería producir determinadas características fundamentales: el intestino debe exhibir alteraciones morfológicas, inflamación, síntomas y signos de la fisiopatología similar o idéntica a la EII humana. También el animal de interés debe tener una base genética bien definida, además de un sistema inmune bien caracterizado. Deben además, poder utilizarse reactivos que sean fácilmente disponibles y accesibles, junto con criterios bien definidos para la gestión y/o manipulación exitosa.

Los modelos animales para el estudio de las EII se pueden clasificar en dos categorías: modelos inducidos y modelos espontáneos. Bajo la denominación de **modelos espontáneos** se engloban los modelos producidos por manipulación genética o por transferencia de poblaciones celulares efectoras en distintas cepas murinas. Los **modelos inducidos** por la administración de diversos agentes químicos adquirieron relevancia por ser relativamente más económicos, de fácil manipulación y razonablemente reproducibles (Mañé Almero, 2007; Kawada y col., 2007) estando en todos ellos fundamentalmente implicada una respuesta inmune innata exacerbada como principal agente iniciador del daño histopatológico. La colitis experimental puede inducirse mediante la administración de enemas intracolónicos de ácido acético, ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS)/etanol y oxazolona. Otras vías de administración son la oral para los polímeros y polisacáridos sulfatados, por ejemplo el dextran sulfato de sodio (DSS) y la subcutánea para la ciclosporina e indometacina. Las colitis inducidas de forma oral cursan una fase aguda que puede durar entre una y varias semanas, mientras que las colitis inducidas por enemas la fase aguda se limita a unos 3 días post-inducción. En la fase aguda se observa un aumento de

marcadores inflamatorios que se correlacionan con la gravedad del proceso inflamatorio intestinal. Estos mediadores inflamatorios provienen del metabolismo del ácido araquidónico (eicosanoides, generados por activación de la enzima ciclo-oxigenasa COX), del metabolismo oxidativo (metabolitos reactivos de oxígeno, iNOS, mieloperoxidasa, etc.) y de expresión de mediadores inflamatorios a nivel intestinal (citoquinas, factores de crecimiento). En general, el proceso inflamatorio intestinal evoluciona llegando a resolverse de forma espontánea.

Entre los modelos de colitis experimental más empleados en la actualidad se destacan la colitis inducida por TNBS y por DSS. En estos modelos se puede distinguir una fase aguda inicial que puede evolucionar hacia un proceso inflamatorio de características crónicas con presencia de estenosis, adherencias, engrosamiento de la pared intestinal, diarrea sanguinolenta y una significativa pérdida de peso de los animales.

El modelo experimental de inducción de colitis por administración intrarrectal de TNBS en etanol, genera inflamación en la mucosa con un perfil de activación tipo Th1, con una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-12 (Jurjus y col., 2004) y una lesión continua, restringida al colon distal. Se ha sugerido un mecanismo patogénico basado en la capacidad del etanol/TNBS de debilitar la barrera mucosa, lo que facilitaría el contacto entre antígenos lumenales colónicos y la lamina propia (Morris y col., 1989). Consecuentemente, se iniciaría una fase inicial con la participación de macrófagos y neutrófilos activados por varios estímulos que generan grandes cantidades de metabolitos altamente reactivos de oxígeno como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Adicionalmente, el TNBS puede actuar como hapteno modificando la estructura de proteínas de la superficie celular por su capacidad de unirse covalentemente a residuos de lisina y tirosina provocando una respuesta inmune por parte de macrófagos y linfocitos T (Grisham y col., 1992). Este último mecanismo puede ser relevante en modelos de administración crónica de TNBS. La principal lectura de este modelo es la histopatología del recto. El daño tisular se caracteriza por edema en la capa submucosa, un gran infiltrado linfocitario y daño epitelial con eventual destrucción de la capa mucosa. Se ha descrito que la variabilidad genética en los ratones, así como la edad y por tanto el peso de los mismos al momento del ensayo influyen en el correcto establecimiento del modelo.

### **3. Estrategias para la prevención de enfermedades inflamatorias intestinales**

Muchos microorganismos probióticos han demostrado la capacidad de prevenir y tratar la inflamación intestinal debido a sus propiedades inmunomoduladoras, en modelos animales (Sinagra y col., 2013; Shanahan & Quigley, 2014) tal como se resumen en la Tabla 3.1.



**Tabla 3.1:** Efectos de microorganismos probióticos en modelos animales de inflamación intestinal

Probiótico	Modelo empleado/ Administración	Mecanismo	Referencia
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716	TNBS/1x10 <sup>9</sup> UFC/animal en agua de bebida diariamente 2 semanas previas o diariamente 21 días post instilación	Capacidad antioxidante ↓ IL-6	Mané y col., 2009
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT5716 (viable y no viable)	TNBS/ 1x10 <sup>8</sup> UFC/animal diariamente, durante 3 semanas	↓IL-1β , TNF-α, iNOS	Rodrigues-Nogales y col., 2015
<i>K. marxianus</i> CIDCA 8154	TNBS/ <i>Ad libitum</i> en agua de bebida (1x10 <sup>6</sup> UFC/ml) 3 días previos	Control del estrés oxidativo	Romanin y col., 2015
Formulación <i>Bifidobacterium lactis</i> KCTC 11904BP, <i>L. casei</i> KCTC 12398BP, <i>L. plantarum</i> KCTC 10782BP y <i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP	TNBS/ Administración intrarrectal y en agua de bebida	↓ IL-6 y FasL	Cha y col., 2014
<i>L. fermentum</i> ACA-DC 179	TNBS/1x10 <sup>8</sup> UFC/animal diariamente, 5 días previos	↑ IL-10	Zoumpopoulou y col., 2008
<i>Lactobacillus helveticus</i> NS8	TNBS/Intragástrica 1x10 <sup>8</sup> UFC/animal 5 días previos hasta 1 día post instilación.	↑ IL-10	Rong y col., 2015
<i>Bifidobacterium infantis</i>	TNBS/6x10 <sup>9</sup> UFC/animal, diariamente durante 3 semanas	↓Th1 y Th17 ↑ Treg	Zuo y col., 2014
<i>Lactobacillus casei</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>	TNBS/Intragástrica, diariamente 1, 2 y 3 semanas previas.		Bellavia y col., 2014
<i>Lactobacillus plantarum</i> 21	TNBS/Intragástrica 1x10 <sup>10</sup> UFC/animal 2 veces al día durante 2 semanas luego de inducida la inflamación	Propiedades inmunomoduladoras y antioxidantes	Satish-Kumar y col., 2015
Compuesto “Peifeikang” ( <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> )	TNBS/ Intragástrica 0,63 g/animal, diariamente 2 semanas previas	↓ TNF-α ↑ IL-10	Wan y col., 2011
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> M1	DSS ( <i>germ-free</i> )/Intragástrica 2x10 <sup>8</sup> UFC/animal cada 2 días, durante 2 semanas	↑ células productoras de mucus	Chen & Chen, 2013
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> JCM 1222T	DSS/ Administración intragástrica, diariamente 1x10 <sup>7</sup> UFC/animal desde inicio del tratamiento con DSS	↓IL-17A	Miyauchi y col., 2013
“Duolac-Oro” ( <i>B. lactis</i> KCTC 11904BP, <i>B. longum</i> KCTC 12200BP, <i>B. bifidum</i> KCTC 12199BP, <i>L. acidophilus</i> KCTC 11906BP, <i>L. rhamnosus</i> KCTC 12202BP y <i>Streptococcus thermophilus</i> KCTC 11870BP)	DSS/Administración oral 3 veces por semana durante 4 semanas.	↓ IL-6	Yoon y col., 2014
Kefir comercial (Danisco®, Poland): <i>L. lactis</i> spp, <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. y levaduras	DSS/Intragástrica diariamente, durante 14 días	↓ MPO, TNF-α, iNOS	Senol y col., 2015
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	DSS/ Intragástrico 1,5-2x10 <sup>8</sup> UFC/animal, <i>germ free</i>	↑ ZO-1	Ukena y col., 2007
VSL#3 ( <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> y <i>S. thermophilus</i> )	DSS/ Intragástrico 15 mg/animal, diariamente	Protección frente a la ↓ permeabilidad intestinal	Mennigen y col., 2009

Sin embargo, los mecanismos exactos que subyacen a los efectos de los probióticos son aún poco conocidos y se cree que, entre otros mecanismos posibles, la administración de bacterias probióticas puede restablecer el equilibrio de la microbiota (Veiga y col., 2014). Algunos autores también han evidenciado la efectividad de la utilización de prebióticos y fibra dietaria en modelos de inflamación intestinal (Cherbut y col., 2003; Hou y col., 2011). Maslowski y col. (2009) estudiaron de forma comparada un modelo de inflamación inducida por DSS en ratones convencionales y en ratones *germ-free* demostrando que la microbiota juega un rol importante en la reducción de la inflamación inducida. Estos autores demostraron que el tratamiento con acetato mejoró los índices de inflamación en un modelo de colitis inducida por DSS en ratones *germ-free*. Es por ello que consideraron que los metabolitos de la fermentación colónica podrían contribuir al mejorar los síntomas de la EII. Posteriormente Macia y col. (2015) demostraron que el consumo de una dieta alta en fibra produjo niveles muy altos de acetato en intestino de ratones y confirmaron mediante la administración de este ácido que era el responsable de mejorar los signos clínicos y la inflamación del tejido en un modelo de inflamación intestinal inducida por DSS. Malheiros Silveira y col. (2015) estudiaron el efecto del consumo de una dieta alta en fibra en combinación con el probiótico *Bifidobacterium longum* y del acetato, en un modelo murino de colitis crónica inducida por DSS, sugiriendo la efectividad de estas estrategias cuando se inicia el tratamiento antes de la administración de DSS. Komiyama y col. (2011) demostraron el efecto beneficioso de un prebiótico desarrollado a partir de salvado de arroz en un modelo de colitis inducida por TNBS, modulando la composición de metabolitos en el entorno colónico y regulando la diferenciación de células inmunes. Masayuki y Mogami (2005), observaron que el suero de leche fermentado con *Propinibacterium freudenreichii* ET-3 aceleró significativamente la recuperación de la colitis inducida por TNBS y sugieren que el ácido propiónico presente en este producto podría ser responsable de dicho efecto. Otros trabajos han sido orientados al estudio de la utilización de prebióticos que favorezcan el desarrollo de *F. prausnitzii* (Louis & Flint, 2009; Ramirez-Farias y col., 2009) que modifica el perfil de AGCC en intestino. Estos resultados sugieren posibles estrategias dirigidas a la modificación del entorno intestinal a fin de prevenir/controlar la enfermedad inflamatoria.



## OBJETIVOS

Considerando la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial del lactato observada en ensayos *in vitro* con cultivos de células epiteliales y la evidencia del rol de los AGCC en el control de las enfermedades inflamatorias intestinales, se planteó como objetivo del presente capítulo estudiar el efecto de la administración de lactato en un modelo murino de inflamación intestinal inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico (TNBS).

### Objetivos específicos

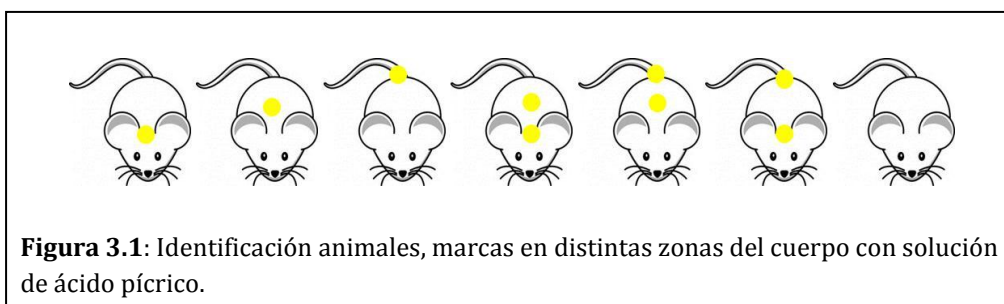
- Estudiar el consumo de líquido, la humedad de las heces, el aumento de peso y el perfil de ácidos orgánicos en materia fecal de animales a los que se les administró lactato en agua de bebida.
- Evaluar la el efecto de la administración de lactato en un modelo de colitis inducida por TNBS sobre parámetros asociados con el desarrollo de la patología, entre ellos, la modificación del peso, la histopatología del colon, la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-6 y la translocación microbiana a hígado.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales utilizados y condiciones de alojamiento

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c AnN pertenecientes a la categoría libres de patógenos específicos, de seis semanas de edad, obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Los progenitores de esta cepa se obtuvieron del *National Institute of Health* (NIH), EEUU. Para identificar a los animales dentro de cada jaula, se les realizó una marca con solución saturada de ácido pícrico (1,3 % p/v) en distintas zonas del cuerpo como indica la Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Identificación animales, marcas en distintas zonas del cuerpo con solución de ácido pícrico.

Los ratones fueron mantenidos en cubetas de plástico, con un lecho de viruta esterilizada, con ciclos de 12 h luz/oscuridad y la temperatura se fijó en  $22 \pm 2$  °C. El traslado de los mismos hacia el bioterio del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, CONICET-UNLP) donde se ejecutaron los protocolos, se realizó con una semana de anticipación para permitir a los animales tener un periodo de adaptación al nuevo ambiente y así disminuir el estrés causado por el transporte y el cambio de las condiciones de alojamiento. Durante los experimentos los ratones fueron alimentados con una dieta en forma de pellets y agua *ad libitum*, asimismo se controló la masa corporal en balanza de precisión (Scout®Pro, Ohaus) y evaluó diariamente el comportamiento y estado general de los animales, analizando signos asociados a malestar o dolor siguiendo los lineamientos establecidos por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales (1998) y lo descrito por Langford y col. (2010).

## **2. Modelo murino de colitis inducida por administración de ácido 2,4,6-trinitrobencen-sulfónico (TNBS)**

Si bien los modelos experimentales *in vivo* nunca podrán llegar a sustituir al ser humano como modelo paradigmático para el estudio de la EII, las consideraciones éticas obvias hacen que, hoy por hoy, estos modelos animales tengan una gran vigencia. El protocolo utilizado en este trabajo ha sido presentado ante el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP (CICUAL) y se encuentra en evaluación (Nº de protocolo: 011-00-15).

### **2.1. Administración de lactato en agua de bebida**

Se realizaron 2 ensayos independientes utilizando un total de 20 animales en cada uno. Un grupo de 10 animales consumió una solución de ácido láctico 150 mM o 300 mM, neutralizada, en agua de bebida durante todo el ensayo; mientras que a los 10 animales restantes se les administró siempre agua corriente esterilizada. Se controló el peso de los animales en balanza de precisión (Scout®Pro, Ohaus), el consumo de líquido y se tomaron muestras de materia fecal al inicio del tratamiento y luego de 2 y 5 días. Al quinto día se indujo la colitis mediante instilación vía rectal de 200 µl de solución de TNBS 2,5 % p/v en etanol 50% v/v (5 mg de TNBS por animal) a 5 animales de cada grupo. Los animales restantes fueron instilados de la misma manera con 200 µl de vehículo (etanol 50 % v/v en agua destilada) como control. Luego de cada instilación, los ratones se mantuvieron inmovilizados en posición vertical con la cabeza hacia abajo, durante 30 seg para evitar la eliminación de la solución administrada.

### **2.2. Administración de lactato intrarrectal**

Se realizaron 3 ensayos independientes, en los cuales se utilizaron 20/30 ratones. Los animales fueron aleatoriamente divididos en 4 grupos. En este esquema experimental, se realizaron 2 instilaciones con 200 µl cada una, de las condiciones que se describen en la Tabla 3.2, con una diferencia de 2 h entre la primera y la segunda instilación.

**Tabla 3.2:** Protocolo experimental desarrollado en el modelo de colitis inducida por TNBS.

<b>Lote</b>	<b>1<sup>ra</sup> instilación</b>	<b>2<sup>da</sup> instilación</b>
<b>PBS/Vehículo</b>	PBS	Vehículo
<b>Lactato/Vehículo</b>	Lactato 200 mM	Vehículo
<b>PBS/TNBS</b>	PBS	TNBS
<b>Lactato/TNBS</b>	Lactato 200 mM	TNBS

La solución de lactato 200 mM (J. T. Baker, USA) fue preparada en PBS, pH=7.0. La solución denominada vehículo consiste en etanol 50 % v/v en agua destilada y corresponde a la solución en la que se solubiliza el TNBS. La inducción de la colitis se realizó mediante instilación vía rectal de TNBS/etanol o vehículo como se detalló anteriormente.

### 3. Eutanasia y toma de muestras

Se realizó un seguimiento del peso de los animales luego de los tratamientos hasta el sacrificio por dislocación cervical a las 48 h. La disección se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo I utilizando material quirúrgico estéril. Se colectó una fracción de aproximadamente 0,5 cm del recto de los animales, de la zona de instilación y se colocó solución fijadora de formaldehído 10 % para realizar los preparados histológicos y el análisis histopatológico. Los cortes se prepararon utilizando la técnica de tinción con hematoxilina-eosina (ver Apéndice). También se tomó en forma estéril una fracción del lóbulo mayor del hígado de los animales para analizar la translocación de microorganismos hacia este órgano, como se detalla a continuación.

### 4. Translocación de microorganismos

Las porciones de hígado colectadas, se colocaron en tubos estériles previamente tarados. En función del peso de la muestra recogida, se colocó un volumen de caldo BHI (OXOID, England) de manera de obtener 1 g órgano/10 ml. Estas suspensiones fueron trituradas y homogeneizadas. Se sembraron 100 µl en placas de agar LB o BHI (ver Apéndice) para la observación del desarrollo de microorganismos viables totales. Asimismo, los caldos con los homogenatos se enriquecieron mediante incubación 24 h a 37 °C y se sembraron nuevamente en placas de agar BHI o LB. Se observó el desarrollo de microorganismos luego de 48 h de incubación a 37 °C.



## 5. Cuantificación de IL-6 en suero

Se colectó sangre mediante punción del seno submaxilar en el momento previo a la instilación y a las 24 y 48 h luego de la misma. Seguidamente se obtuvo el suero sanguíneo mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, y se almacenó a -20 °C para la determinación de IL-6 circulante, mediante método de ELISA utilizando un kit comercial (BD Bioscience OptEIA TM Mouse, IL-6 ELISA Kit, Franklin Lakes, NJ, USA) (ver Protocolo en el Apéndice).

## 6. Score de daño histopatológico

El daño histopatológico se determinó siguiendo el criterio descripto por Obermeier y col. (1999). Este sistema registra dos puntajes por separado evaluando **daño epitelial** y el **infiltrado** tal como se detalla en la Tabla 3.3. Los preparados fueron evaluados a doble ciego, y los puntajes sumados, para obtener el *score* histopatológico.

**Tabla 3.3:** *Score* histopatológico (Obermeier y col., 1999).

Daño epitelial		Infiltrado	
Ningún daño	0	Ninguno	0
Mínima pérdida de células caliciformes	1	Infiltrado alrededor de la base de las criptas	1
Pérdida importante de células caliciformes	2	Infiltrado en la capa muscular de la mucosa	2
Pérdida mínima de criptas y extensa de células caliciformes	3	Extenso infiltrado en la muscular de la submucosa y edema	3
Pérdida extensa de criptas	4	Infiltrado en la submucosa y edema	4
Total: entre 0 y 8			

## 7. Análisis de humedad y perfil de ácidos orgánicos en materia fecal

En el modelo de administración de lactato 150 mM o 300mM en agua de bebida se colectó materia fecal de ambos grupos antes de iniciar el tratamiento y luego de 2 y 5 días.

Se determinó humedad en las heces mediante secado en estufa a  $103 \pm 2$  °C durante 72 h. Asimismo se analizó el perfil de ácidos orgánicos mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando una columna de intercambio iónico (AMINEX 87-H HPX, Biorad) y aplicando la técnica descripta en Materiales y Métodos del Capítulo 1. Para ello, las heces colectadas se homogeneizaron en agua destilada en relación 1:5, se centrifugaron 10 min a 10000 xg y se analizó el sobrenadante.

## 8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un post-test de Bonferroni, de comparaciones múltiples con un nivel de significación  $\alpha=0,05$ , o Test t Student para comparación de medias; utilizando el programa GraphPad Prism, versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Para el análisis estadístico de proporciones se determinó un nivel de significación nivel  $\alpha=0,05$  y se utilizó el programa Infostat (Córdoba, Argentina).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Efecto de la administración de lactato en agua de bebida

Se administró lactato a ratones en el agua de bebida en concentración 150 mM y 300 mM durante 5 días *ad limitum*, mientras que los controles recibieron sólo agua. El empleo de la concentración 150 mM surge a partir de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* descritos en el Capítulo 2.B, la cual además podría alcanzarse en la fracción no microbiana de kefir. La utilización de una concentración superior (300 mM) surge a partir de resultados obtenidos por otros autores que analizaron el efecto del acetato en un modelo de inflamación intestinal inducido por DSS y describieron que en ratones *germ-free* la administración de acetato 150 mM en agua de bebida protegió a los animales frente a la inflamación inducida, mientras que para ratones convencionales necesitaron administrarlo en una concentración superior (300 mM) para obtener un efecto protector (Macia y col., 2015).

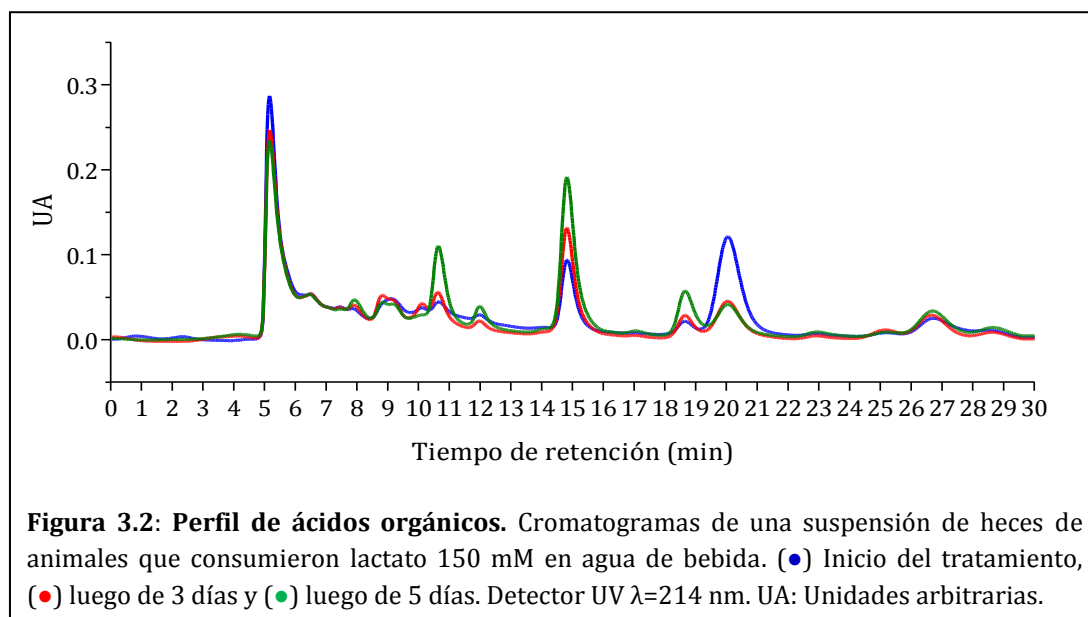
Se observó que el consumo de bebida por ratón de los grupos control y tratados con lactato fue de entre 3,5 y 5 ml/día. Asimismo, tanto el aumento de peso de los animales como el porcentaje de humedad de sus heces no se modificaron significativamente con el tratamiento (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4:** Humedad en materia fecal y aumento de peso de animales que consumieron agua o lactato 150 mM y 300 mM durante 0, 2 y 5 días.

Humedad % (p/p)			
	Control	Lactato 150 mM	Lactato 300 mM
<b>Día 0</b>	62,3 ±3,9 <sup>a</sup>	59,3 ±1,3 <sup>a</sup>	66,0 ±0,9 <sup>a</sup>
<b>Día 2</b>	56,0 ±3,5 <sup>a</sup>	56,7 ±1,3 <sup>a</sup>	63,5 ±0,7 <sup>a</sup>
<b>Día 5</b>	59,9 ±0,7 <sup>a</sup>	58,3 ±1,4 <sup>a</sup>	61,2 ±0,7 <sup>a</sup>
% Aumento de peso			
	Control	Lactato 150 mM	Lactato 300 mM
<b>Día 2</b>	2 ±0,01 <sup>a</sup>	3 ±0,02 <sup>a</sup>	3 ± 0,03 <sup>a</sup>
<b>Día 5</b>	5 ±0,01 <sup>a</sup>	8 ±0,02 <sup>a</sup>	5 ±0,02 <sup>a</sup>

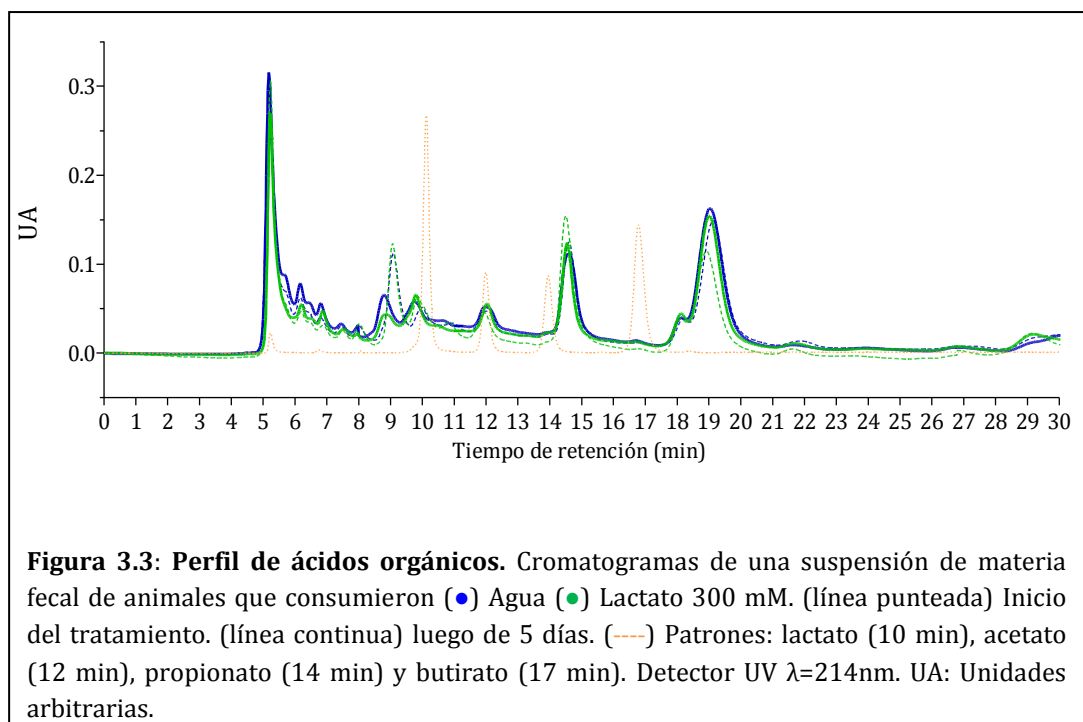
Los distintos superíndices indican diferencias significativas con un valor  $\alpha=0,05$ . ANOVA seguido de Test de Bonferroni.

De esta forma, los resultados indican que el consumo de lactato 150 o 300 mM en agua de bebida es aceptado por los animales, no les induce diarrea ni altera su normal crecimiento. Con el objetivo de analizar si el consumo de lactato podría incidir en la composición de ácidos orgánicos en el lumen intestinal, a modo de aproximación determinamos el perfil de ácidos orgánicos presentes en las heces de animales que consumieron este metabolito. Se realizó un primer análisis de perfil de ácidos orgánicos de un *pool* de materia fecal de animales que consumieron lactato 150 mM (Figura 3.2).



En este caso se observaron diferencias entre los perfiles obtenidos con los distintos tiempos de consumo de lactato. Por ejemplo, los picos correspondientes a tiempos de retención de 5,5 y 21 min, disminuyen con el consumo de lactato, mientras que otros picos aumentan como se observa con los analitos que eluyen a 10,6; 12; 15; 17; 18,6 y 26,8 min. De acuerdo a los tiempos de retención, los picos de 12 y 17 min podrían corresponder a acetato y butirato respectivamente, y estarían aumentando su concentración con el consumo de lactato. Se detectó un pico con tiempo de retención equivalente al lactato (10 min) en el cromatograma correspondiente al tercer día de consumo, sin embargo, no se observó luego de 5 días de consumo.

En el caso de los animales que consumieron lactato 300 mM se analizó el perfil de metabolitos en materia fecal al inicio del tratamiento y luego de 5 días obteniéndose los cromatogramas que se muestran a continuación (Figura 3.3).



En la Figura 3.3 se observa que el consumo de lactato 300 mM no afectó significativamente el perfil de metabolitos en materia fecal. En todos los casos se observó un pico con tiempo de retención 12 min, coincidente con acetato, pero que no fue alterado significativamente por el consumo de lactato 300 mM. Además, a pesar del consumo de lactato en agua de bebida durante 5 días, este metabolito no se detectó en la materia fecal, indicando que pudo haber sido metabolizado y/o consumido a distintos niveles del tracto gastrointestinal.

## 2. Efecto de la administración de lactato en agua de bebida en un modelo de colitis inducida por TNBS

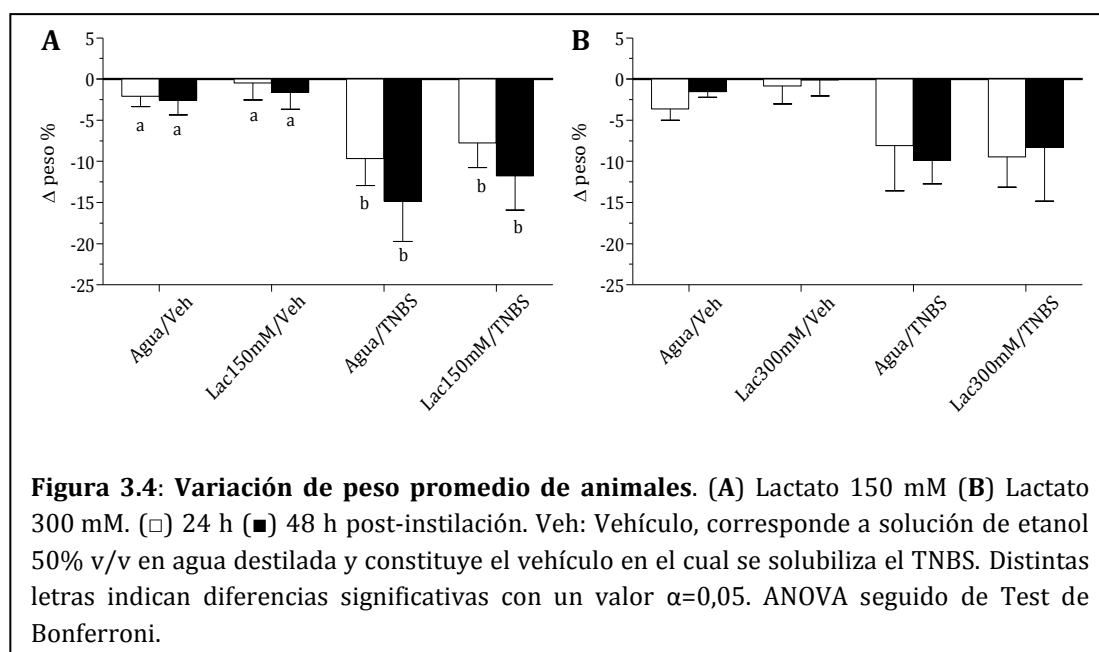
Se utilizó un modelo murino de colitis aguda inducida por TNBS que consiste en la inducción de inflamación del intestino mediante el tratamiento con TNBS en solución de etanol que se instila por vía rectal. El alcohol altera la capa epitelial y expone la lámina propia subyacente a los componentes bacterianos, induciendo la inflamación. Este modelo tiene muchos de los rasgos característicos de la EC en los seres humanos, incluyendo la inflamación severa asociada con diarrea, prolapso rectal, pérdida de peso y la inducción masiva de IL-12 e INF- $\gamma$ , impulsando una respuesta tipo Th1 (Neurath y col., 1995). A pesar de las diferencias etiopatológicas entre el proceso inflamatorio intestinal inducido por TNBS y la EII, debido a su simplicidad y reproducibilidad, este modelo animal es uno

de los más empleados en el estudio de los procesos inflamatorios intestinales (Brenna y col., 2013).

Miembros de nuestro grupo de investigación evaluaron previamente la dosis efectiva de TNBS y el tiempo de duración del ensayo capaz de generar una histopatología acorde con el cuadro de inflamación aguda (Romanin, 2013). De acuerdo a sus resultados, en el presente trabajo se administraron 5 mg de TNBS por animal y se sacrificaron luego de 48 h.

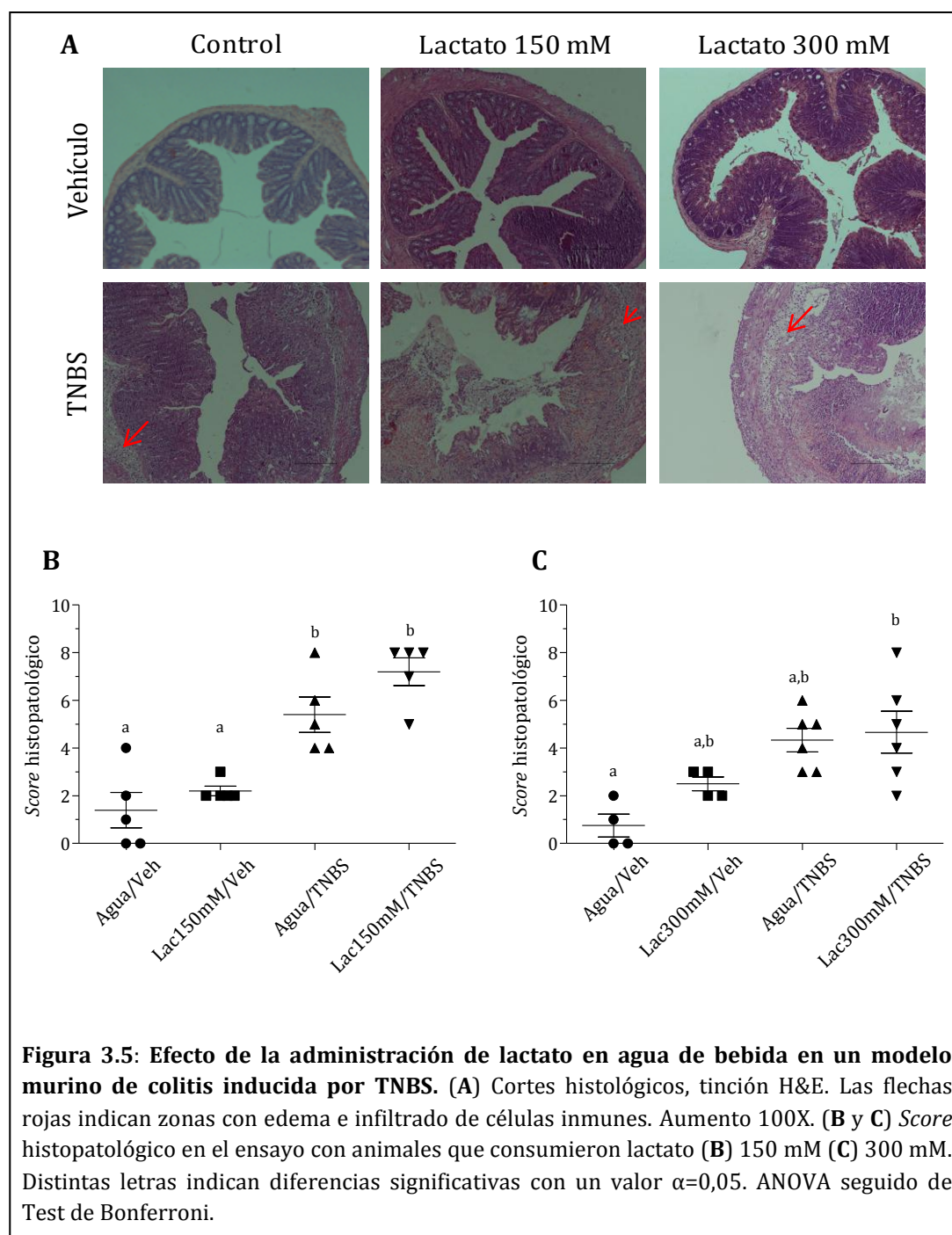
Luego de 5 días de tratamiento con lactato 150 mM o 300 mM en agua de bebida, se evaluó la respuesta de los animales en el modelo de colitis inducida por TNBS. Se extrajo una porción de recto próxima al sitio de instilación para evaluar el daño histológico. También se tomó en forma aséptica una muestra de hígado para evaluar la translocación de microorganismos a éste órgano.

En la Figura 3.4 se muestra la variación de peso promedio de los distintos grupos experimentales, luego de 24 y 48 h de instilación.



La variación de peso es un parámetro que refleja en parte el daño producido por la administración de TNBS. En los grupos que consumieron agua o lactato y que fueron instilados con TNBS, se observó una disminución de peso mayor que para los respectivos grupos instilados con vehículo, resultando sólo significativa en el ensayo en el cual se administró lactato 150 mM. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la variación de peso entre los animales instilados con TNBS que consumieron agua o lactato en ambos ensayos.

En la Figura 3.5 se presentan las fotografías representativas de cada grupo experimental seguidas de un gráfico donde se muestran los valores de *score* histopatológico asignado a cada animal.



Los cortes histológicos del recto de los animales de los grupos que consumieron agua y lactato 150 o 300 mM instilados con vehículo presentaron estructuras sin signos de daño



epitelial ni infiltrado y no se observaron diferencias significativas en el *score* histopatológico asignado a estos grupos. Por otro lado, los cortes histológicos del recto de los animales que consumieron agua o lactato en ambas concentraciones y recibieron TNBS se caracterizaron por presentar un importante daño epitelial con destrucción de la mucosa, pérdida de criptas, presencia de sangre, edema e intensa infiltración de células inflamatorias.

El grupo de animales que recibió lactato en concentración 150 mM en agua de bebida y fue tratado con TNBS presentó un *score* histopatológico de  $7,20 \pm 1,30$  mientras que su respectivo grupo control tuvo un *score* de  $5,40 \pm 1,67$ , valores que no resultaron estadísticamente diferentes (Figura 3.5 B). El mismo comportamiento se observó en el ensayo en el cual se administró lactato en concentración 300 mM, donde el *score* fue de  $4,66 \pm 2,1$  para el grupo que recibió lactato y de  $4,33 \pm 1,21$  para el control (Figura 3.5 C). Puede observarse que ambos ensayos presentaron diferencias en cuanto al daño inducido por el TNBS/etanol, que podría deberse a las variaciones propias de los modelos *in vivo*. Sin embargo, estos resultados permitieron concluir que el tratamiento con lactato 150 mM o 300 mM en agua de bebida no ejerció una protección frente a la inflamación intestinal aguda inducida por TNBS.

La administración de TNBS deteriora la función de barrera de la mucosa, permitiendo la exposición de la lámina propia con la microbiota presente en la luz intestinal, asimismo las bacterias pueden llegar al torrente sanguíneo y translocar a órganos estériles. En la Tabla 3.5 se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la translocación microbiana a hígado.

**Tabla 3.5:** Translocación microbiana a hígado en modelo murino de colitis inducida por TNBS.

Grupo experimental	Translocación positiva/Total	Porcentaje
Agua/Vehículo	0/6	0% <sup>a</sup>
Lactato 150 mM/Vehículo	0/5	0% <sup>a</sup>
Agua/TNBS	2/5	40% <sup>b</sup>
Lactato 150 mM/TNBS	3/5	60% <sup>b</sup>
Agua/Vehículo	0/4	0% <sup>a</sup>
Lactato 300 mM/Vehículo	0/4	0% <sup>a</sup>
Agua/TNBS	4/6	66,67% <sup>b</sup>
Lactato 300 mM/TNBS	3/6	50% <sup>b</sup>

Distintos superíndices indican diferencias significativas con un valor  $\alpha=0,05$ . Análisis estadístico de proporciones.

Como se observa en la Tabla 3.4, los grupos experimentales que consumieron agua o lactato en ambas concentraciones instilados con vehículo no presentaron translocación microbiana a hígado. Mientras que, en los grupos instilados con TNBS este parámetro fue positivo y no se observaron diferencias significativas entre el grupo que consumió agua (control) y los grupos que consumieron lactato 150 o 300 mM.

Junto con los parámetros analizados previamente estos ensayos indicaron que el consumo de lactato 150 o 300 mM no ejerció un efecto perjudicial para los animales ya que no afectó significativamente el aumento de peso ni la humedad de las heces, tampoco se observaron daños en cuanto a la histopatología del epitelio intestinal ni provocó la translocación de microorganismos a hígado. Sin embargo, frente a la inflamación y el daño inducido por TNBS el consumo de lactato no presentó ningún tipo de protección en los parámetros analizados.

Dado que el análisis de metabolitos en materia fecal de los animales que consumieron lactato y los que consumieron agua no presentó diferencias y que al mismo tiempo no detectamos lactato luego de 5 días de consumo (aún en concentración 300 mM) podría pensarse que este compuesto estaría siendo o bien absorbido en el intestino delgado y metabolizado o bien podría ser consumido por la microbiota intestinal.

En los últimos años, muchos estudios han mostrado que la microbiota intestinal tiene un papel importante en la fisiopatología de la inflamación intestinal y que uno de los mecanismos a través de los que podría ejercer su efecto es mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), incluyendo propionato, butirato, y acetato. La producción/consumo de ácidos orgánicos a nivel del colon depende del complejo equilibrio en la microbiota. En la Tabla 3.6 se describen los principales grupos de bacterias encontradas en muestras fecales de adultos humanos y sus principales metabolitos de fermentación. Bacterias del género *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* son las principales productoras de acetato, siendo este metabolito el que se encuentra en mayor proporción en el colon. *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium halii*, *Eubacterium uniforme*, *Eubacterium formicigenerans*, *Eubacterium ventriosum*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium ramulus*, *Coprococcus eutactus*, *Roseburia* spp. y *Clostridium* son las principales especies productoras de butirato, mientras que el propionato es producido principalmente por bacterias del género *Bacteroides*, *Roseburia inulinivorans* y algunas otras especies pertenecientes al género *Clostridium* (Louis y col., 2007).

**Tabla 3.6:** Abundancia de los principales grupos de bacterias en muestras fecales de adultos humanos y principales metabolitos de fermentación. Fuente Louis y col., 2007.

Grupo	Abundancia (% del total)	Principales productos de fermentación de hexosas
Gram positivos (Bajo contenido G-C)		
Clostridial cluster XIVa+b	10,8-29	
<i>Roseburia/Eubacterium rectale</i>	2,3-8,8	Butirato, formiato, L-lactato
<i>Eubacterium halii</i>	0,6-3,8	Butirato, formiato, acetato
<i>Ruminococcus obeum</i>	2,5	Acetato
<i>Lachnospira spp.</i>	3,6	Formiato, acetato, lactato, succinato
Clostridial cluster IV	25,2	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	3,8-15,4	Butirato, formiato, D-lactato
<i>Ruminococcus bromii</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	1,7-10,3	Acetato, formiato, lactato, succinato
Clostridial cluster IX	7,1	Propionato y otros ácidos minotarios
Clostridial cluster XVI		
<i>Eubacterium cylindroides</i>	0,4-1,4	Butirato, acetato, lactato, succinato, formiato
<i>Lactobacillus/Enterococcus</i>	0,01-1,8	Lactato, acetato
Gram positivos (Alto contenido G-C)		
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2,5-4,9	L-lactato, acetato, formiato
<i>Atopobium spp.</i>	2,1-11,9	Acetato, formiato lactato
Gram negativos		
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	8,5-27,7	Acetato, propionato, succinato
<i>Proteobacteria</i>	0,1-0,2	Lactato, acetato, succinato, formiato

Como puede verse en la Tabla 3.6, el lactato puede ser generado por diversas especies bacterianas presentes en el colon, y también puede ser producido por las células del huésped. Algunas bacterias pueden utilizar lactato y convertirlo en acetato y butirato (Duncan y col., 2004; Flint y col., 2012). La presencia de dichas bacterias puede ayudar a explicar el hecho de que el lactato no se acumula significativamente en el colon de individuos sanos a pesar de que una proporción significativa de las bacterias del colon puede producirlo (Gibson y col., 1990; Louis y col., 2007). Algunas bacterias pertenecientes a clúster IX de *Clostridium* también pueden contribuir a la utilización de lactato y producción de propionato (Gibson y col., 1990). Sin embargo el lactato puede alcanzar concentraciones muy elevadas en el colon de individuos con colitis ulcerosa (Vernia y col., 1988), posiblemente indicando un fallo en la utilización normal de lactato bajo estas condiciones. Aproximadamente un 80-90% de los AGCC se absorben y son metabolizados por las células epiteliales del colon, una parte también puede entrar en la circulación periférica y el resto es excretado en las heces (Meijer y col., 2010). En muestras fecales de individuos sanos, se encuentra principalmente acetato en concentraciones 40-70 mM; seguido de propionato y butirato (10-30 mM) (Cummings, 1998). La concentración de AGCC total en el lumen del colon se encuentra en el intervalo de 70-130

mM y hasta 200 mM (Sengupta y col., 2006; Maslowski & Mackay, 2011), con relaciones molares de acetato:propionato:butirato que pueden variar entre 49:29:23 y 70:15:15 dependiendo de la dieta, siendo el promedio de estas relaciones 60:20:20, (Bergman, 1990; Tedelind y col., 2007). Dado que la mayor parte de la fermentación bacteriana se produce en el colon proximal, y que los productos de fermentación son en parte absorbidos a través del epitelio intestinal, los niveles fecales son sólo indicativos de las cantidades relativas de cada producto y no se puede suponer que reflejan las tasas de producción (Scott y col., 2008).

Si bien en este trabajo planteamos la administración de lactato, otros autores han obtenido resultados alentadores mediante la utilización de microorganismos probióticos, prebióticos o dietas con alto contenido de fibra, que conducen a la producción de ácidos grasos de cadena corta y disminución de la inflamación.

Se conoce que un desbalance en la microbiota colónica podría ser potencialmente una causa de las enfermedades inflamatorias intestinales, para lo cual estas estrategias podrían incidir significativamente en la restauración de la misma. Pacientes con EII presentan una microbiota luminal anormal, con menor diversidad microbiana, particularmente reducida la concentración de bacterias de los grupos *Clostridium* IV, XIV (*Faecalibacterium prausnitzii*), bifidobacterias y lactobacilos y un aumento de *Mycobacterium aviumparatuberculosis*, *Clostridium difficile*, *Ruminococcus gnavus* y *Enterobacteriaceae*. También se ha sugerido que la falta de bacterias con propiedades anti-inflamatorias podría ser un factor clave en la persistencia de la inflamación (Swidsinski y col., 2002; Sartor, 2008; Sokol y col., 2008). En el caso particular de *Faecalibacterium prausnitzii*, se ha descrito extensamente su efecto antiinflamatorio y capacidad de producir AGCC, principalmente butirato (Sokol y col., 2008; Berry & Reinisch, 2013). Los cambios en la abundancia de *F. prausnitzii* se han relacionado con disbiosis en varios trastornos humanos. Esta especie se encuentra disminuida en la fases inflamatorias, tanto en colitis ulcerosa como en enfermedad de Crohn y se la propone como un marcador de recuperación (Berry & Reinisch, 2013). La administración de *F. prausnitzii* A2-165 y su sobrenadante del cultivo han demostrado un efecto protector en modelos de colitis inducida por TNBS en ratones (Miquel y col., 2013).

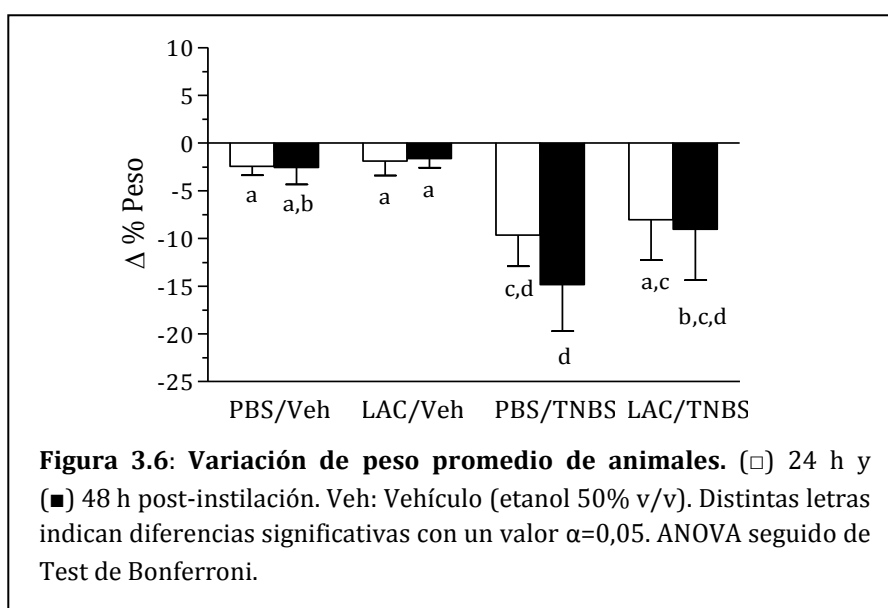
Según los resultados obtenidos en este estudio, el lactato podría estar siendo convertido en otros productos de fermentación como por ejemplo butirato por la microbiota intestinal del ratón. Sin embargo, mediante las técnicas empleadas tampoco se consiguió identificar otros metabolitos en materia fecal. Por todo lo expuesto es posible pensar que con la administración de lactato en agua de bebida no se logra generar una concentración

de lactato a nivel del colon que sea efectiva para modular el efecto producido por la instilación intrarrectal de TNBS/etanol.

### 3. Efecto de la administración intrarrectal de lactato en un modelo de colitis inducida por TNBS

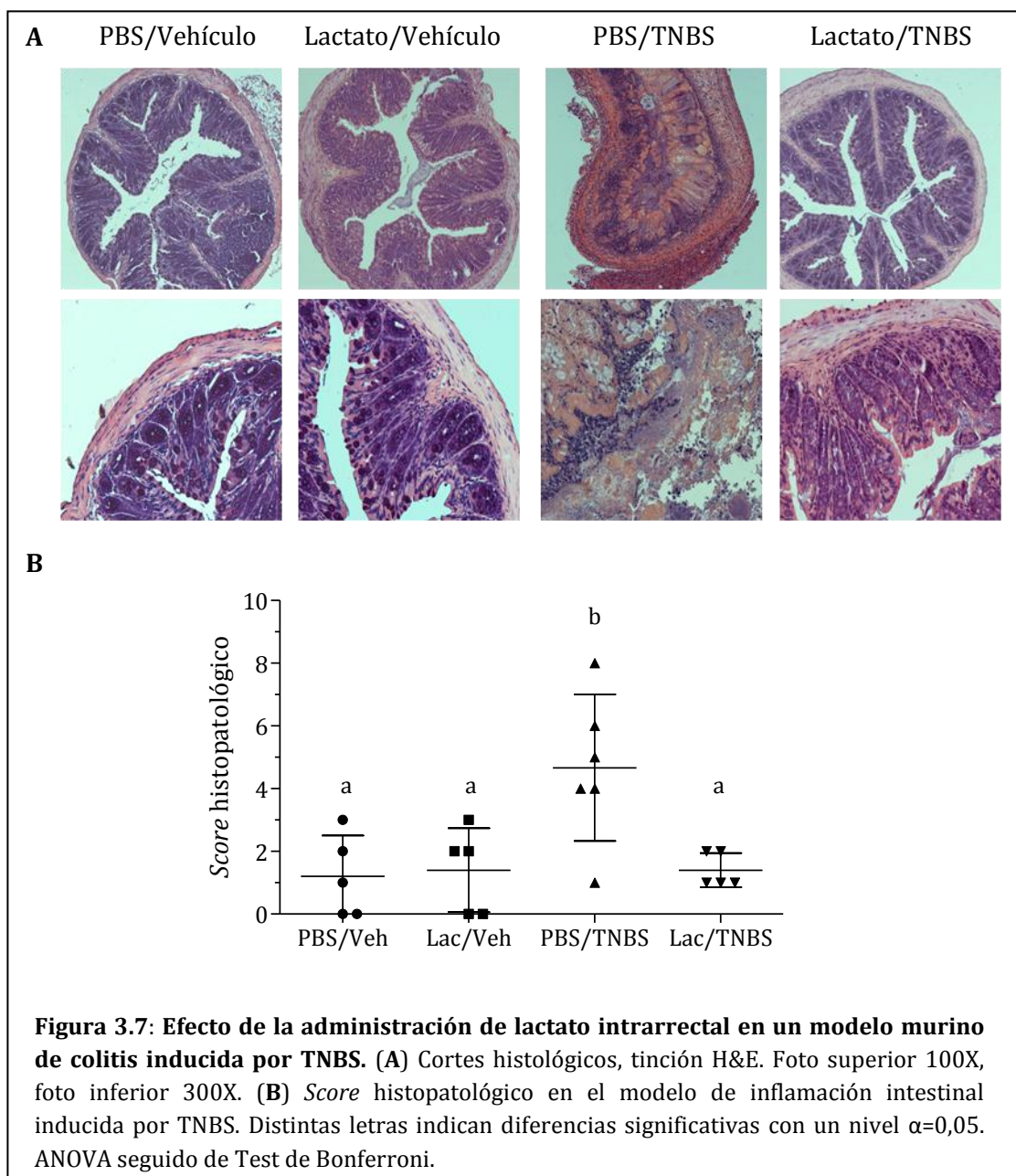
Empleando el modelo de inflamación inducida por TNBS se administraron 200  $\mu$ l de solución de lactato 200 mM en PBS pH=7,4, de manera intrarrectal, previo a la instilación con vehículo (etanol 50 % v/v) o TNBS en etanol 50 %. De esto modo se buscó garantizar el contacto del lactato con las células epiteliales expuestas al agente inflamatorio. Se realizaron 3 ensayos independientes, obteniéndose en todas las oportunidades resultados equivalentes. En estos casos los animales fueron divididos en 4 grupos e instilados en dos oportunidades, la primera vez con 200  $\mu$ l de PBS o solución de lactato 200 mM y luego de 2 h, con 200  $\mu$ l de etanol al 50 % (vehículo) o solución de TNBS al 2,5 % en etanol al 50 %. Se controló el peso de los animales luego de 24 y 48 h. Se colectaron las mismas muestras descritas en el modelo anterior.

En la Figura 3.6 se muestra la variación de peso promedio a las 24 y 48 h post-instilación.



No se observaron diferencias significativas en la variación de peso entre el control que recibió una instilación con PBS y luego con el vehículo y el grupo tratado con lactato y vehículo. Los grupos tratados con TNBS presentaron una disminución de peso significativamente mayor que los instilados con vehículo. No se observaron diferencias significativas en la disminución de peso a las 24 y 48 h entre el grupo control (PBS) y el tratado con lactato, ambos instilados con TNBS.

Analizando la histopatología se observó en todos los experimentos la misma tendencia. En la Figura 3.7 se muestran algunas fotografías representativas y el *score* histopatológico asignado a cada grupo experimental.



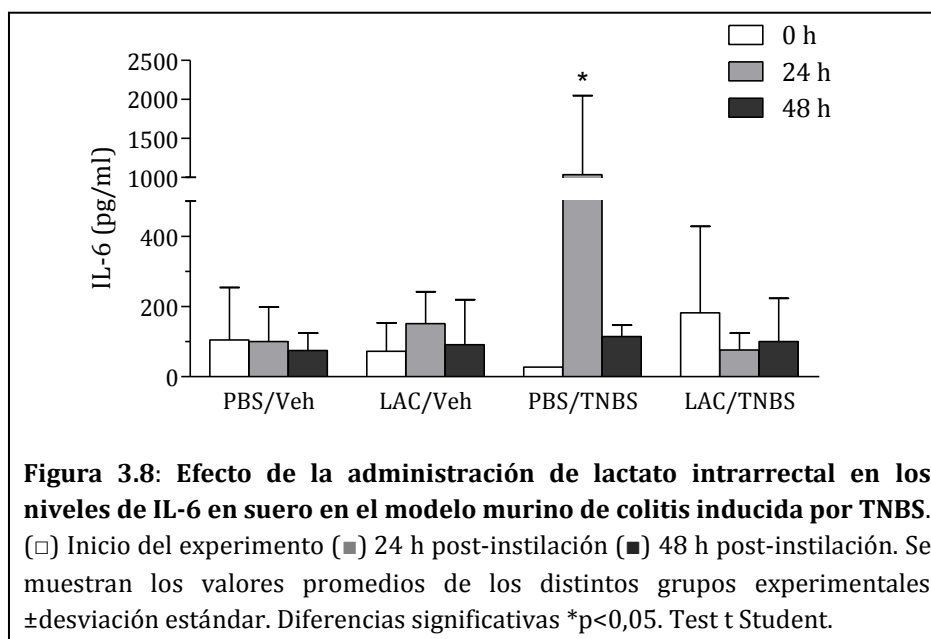
Los animales del grupo instilado primero con PBS y luego con vehículo recibieron un valor de *score* igual o menor a 3, el promedio de este grupo fue de  $1,3 \pm 1,67$ . Los animales que recibieron tratamiento con solución de lactato 200 mM y vehículo recibieron un *score* promedio de  $1,40 \pm 1,34$  que no resultó significativamente diferente del grupo control

(PBS/Vehículo). Los animales que recibieron PBS y luego fueron tratados con TNBS mostraron un fuerte daño epitelial con pérdida de células caliciformes, presencia de sangre, edema e infiltrado de células, el *score* promedio fue de  $4,67 \pm 2,33$ . Finalmente, se observó que los animales pretratados con lactato 200 mM presentaron una significativa protección frente al daño inducido por TNBS, la lesión epitelial fue mínima y los cortes histológicos resultaron similares a los del grupo control (PBS/Vehículo). El *score* promedio de este grupo fue  $1,40 \pm 0,54$  y resultó significativamente diferente del *score* promedio del grupo PBS/TNBS con un valor  $p=0,039$  mientras que no presentó diferencias significativas con los controles instilados con vehículo.

La inflamación se asocia con la producción de diversos mediadores inflamatorios, principalmente citoquinas que son actores clave de la respuesta inmune innata y adaptativa. Ellos modulan importantes funciones celulares y desencadenan las vías de señalización que median la proliferación y la diferenciación de células inmunes. Las citoquinas son producidas y secretadas por diversas células, tales como macrófagos, células dendríticas y en menor medida también células epiteliales. Los estudios realizados con respecto a la naturaleza de la respuesta inmune inducida por la administración rectal de TNBS, revelan la polarización hacia un perfil "Th1", se observa un considerable aumento de IFN- $\gamma$ , IL-12 y cantidades reducidas de IL-4 en comparación con los ratones control instilados con solución de etanol 50% (Neurath y col., 1995; Alex y col., 2009). Por otra parte, el daño a la barrera epitelial permite el contacto de elementos de la microbiota con sensores de la respuesta innata que desencadenan la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, y TNF- $\alpha$ . Por otra parte se producen distintas quimoquinas que causan una afluencia de células inmunes que dan lugar a la inflamación característica de la colitis inducida por TNBS.

En el presente trabajo se determinaron los niveles de IL-6 circulante en los distintos grupos experimentales, al inicio del ensayo y luego de 24 y 48 h de la instilación, (Figura 3.8).





Se observó que los niveles de IL-6 aumentaron significativamente 24 h después del tratamiento con TNBS, sin embargo, su expresión disminuyó luego de 48 h. El tratamiento con lactato intrarrectal redujo significativamente el aumento de IL-6 a las 24 h, mientras que a las 48 h no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

La evaluación de la translocación de microorganismos a hígado dio como resultado que en ninguno de los animales que recibieron tratamiento con lactato intrarrectal y luego TNBS se detectó la presencia de microorganismos en hígado (5 animales), mientras que un 67 % de los animales control tratados con TNBS mostraron desarrollo de microorganismos en hígado (4 animales presentaron translocación microbiana sobre un total de 6 animales que conformaban el grupo). En cuanto a los grupos de animales instilados con vehículo, ninguno presentó translocación microbiana a hígado (5 animales por grupo).

Estos resultados fueron contundentes en cuanto al efecto del lactato a nivel local y sistémico en un modelo de inflamación intestinal agudo, contribuyendo a la disminución del daño epitelial, los signos de inflamación y la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-6, presentando una primera aproximación *in vivo* acerca del rol del lactato en la prevención de la inflamación intestinal. En concordancia con estos resultados, otros autores han reportado el uso de enemas rectales conteniendo mezclas de AGCC, o simplemente butirato para mejorar los parámetros clínicos e inflamatorios en el tratamiento de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (Hamer y col., 2008).



Estos resultados permitieron concluir que si bien el lactato administrado por vía oral no confirió un efecto protector de la inflamación intestinal inducida por TNBS en las dosis ensayadas, la administración intrarrectal del metabolito mostró resultados alentadores en cuanto a su capacidad de atenuar significativamente el proceso inflamatorio y la lesión inducida por TNBS/etanol. La generación de lactato *in situ* por microorganismos adherentes al epitelio intestinal podría contribuir significativamente a la modulación de respuestas proinflamatorias intestinales.

## CONCLUSIONES

- La administración de lactato 150 mM o 300 mM por vía oral a ratones no les produjo diarrea dado que la humedad de las heces no se modificó significativamente respecto a la hallada en animales que consumieron agua, ni afectó el aumento normal de peso.
- El consumo de lactato 150 mM o 300 mM no modificó el perfil de ácidos orgánicos en materia fecal respecto al de los animales que consumieron agua. No se detectó un pico de tiempo de retención equivalente al lactato, indicando que este metabolito podría haber sido absorbido/metabolizado o consumido por la microbiota intestinal.
- El consumo de lactato en agua de bebida no protegió frente al daño epitelial y la inflamación aguda inducida por la administración intrarrectal de TNBS.
- La administración intrarrectal de lactato 200 mM ejerció un efecto protector frente al daño epitelial y la inflamación intestinal aguda inducida por TNBS.
- El lactato administrado en forma intrarrectal disminuyó significativamente los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6 circulante luego de 24 h de inducción de la colitis y protegió frente a la translocación microbiana a hígado.



# Capítulo 4

---

Estudio de los posibles mecanismos involucrados en la actividad biológica del lactato

## INTRODUCCIÓN

### 1. Ácidos grasos de cadena corta y su rol en la salud

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y lactato son los principales productos finales de la fermentación bacteriana en el intestino, incluyéndose dentro de los AGCC al ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico (ácido 2-metilpropanoico), ácido butírico, ácido isovalérico (ácido 3-metilbutanoico) y ácido valérico (ácido pentanoico). La producción de estos metabolitos está determinada por factores como la composición cuali y cuantitativa de la microbiota colónica (Roberfroid, 2005), el tipo de sustrato que se fermenta (Cook & Sellin, 1998) y el tiempo de tránsito intestinal (Hijova & Chmelarova, 2007).

Algunos autores describen que estos metabolitos podrían constituir el "eslabón" en la comunicación entre la microbiota intestinal y el huésped ya que inciden sobre diversas funciones del tracto gastrointestinal. Estos ácidos grasos, además de actuar como fuente de energía para las células epiteliales intestinales, también actúan como moduladores del flujo de sangre (Mortensen y col., 1991), de la motilidad gastrointestinal (Cherbut y col., 1997), la absorción de agua y electrolitos (Vinolo y col., 2011a) y han sido implicados en patologías que afectan el tracto gastrointestinal, tales como cáncer de colon y las enfermedades inflamatorias intestinales (Louis & Flint, 2009). La producción de estos metabolitos disminuye el pH del contenido intestinal, inhibiendo el potencial desarrollo de microorganismos patógenos sensibles (Roy y col., 2006). Además pueden promover la integridad de la función de barrera de la membrana mediante el refuerzo de las uniones estrechas (Mariadason y col., 1997; Commane y col., 2005; Ohata y col., 2005; Tolhurst y col., 2012) y la estimulación de la producción de mucinas (Burger-van Paassen y col., 2009).

La capacidad de modular la respuesta inflamatoria que poseen los AGCC podría depender fundamentalmente de los siguientes mecanismos. Un mecanismo descripto principalmente para el butirato es su efecto sobre la actividad de histona deacetilasas (HDAC) eliminando los grupos acetilo, incrementando la carga positiva de las histonas y por tanto la afinidad de éstas por el ADN. Esta unión condensa la estructura del ADN, impidiendo la transcripción. El butirato a través de este mecanismo puede modular la expresión génica, ejercer un efecto antiproliferativo y anti-inflamatorio (Hinnebusch y col., 2002; Kiefer y col., 2006; Waldecker

y col., 2008a, 2008b; Fusunyan y col., 1999; Zimmerman y col., 2012). Esta actividad inhibitoria de HDAC fue también observada para el propionato (Kiefer y col., 2006; Waldecker y col., 2008a), lactato (Latham y col., 2012) y algunos autores también lo han descrito para el acetato (Kendrick y col., 2010).

Varios informes describen que los AGCC tienen un efecto inhibitorio de la vía NF- $\kappa$ B, uno de los principales factores de transcripción que regulan genes implicados en la inmunidad innata, el control del ciclo celular y la apoptosis (Hijova & Chmelarova, 2007; Tedelind y col., 2007; Usami y col., 2008; Argañaraz-Martínez y col., 2013).

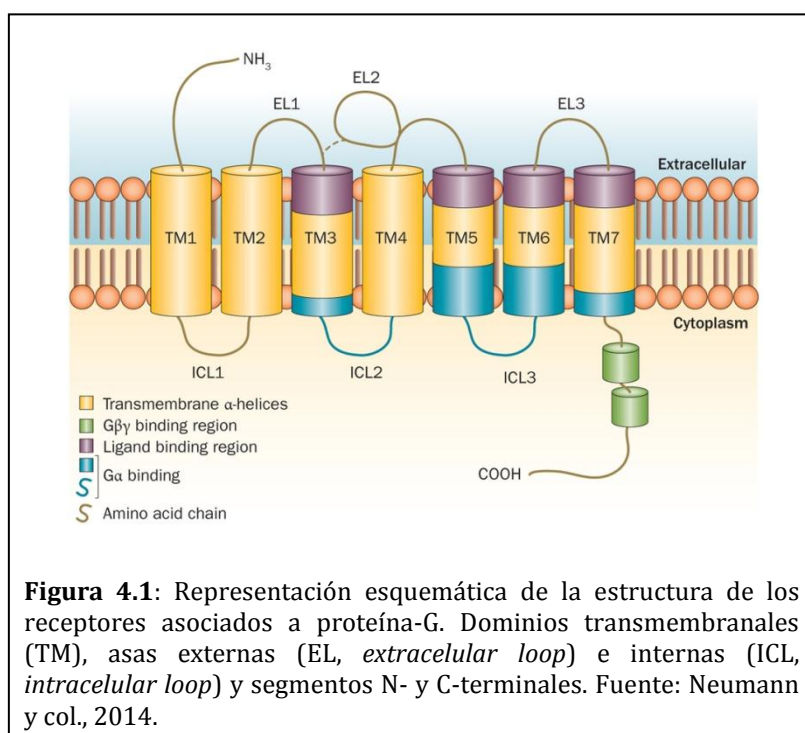
Los AGCC, favorecen la diferenciación de linfocitos T hacia “Treg” FOXP3<sup>+</sup>, los cuales constituyen una población especializada de células T con capacidad de controlar/suprimir la respuesta inmune (Maslowski y col., 2009; Arpaia y col., 2013; Furusawa y col., 2013; Smith y col., 2013; Singh y col., 2014; Dwivedi y col., 2016) y favorecen la producción de prostaglandina E2, la cual constituye un mediador clave en la iniciación y resolución de la inflamación (Cox y col., 2009).

Se ha reportado que los AGCC, son ligandos de receptores de membranas asociados a proteínas G (GPRs), a través de los cuales podrían también ejercer sus efectos (Offermanns, 2014).

## 2. Receptores acoplados a proteínas G

La interacción de los ácidos grasos de cadena corta con el hospedador esta mediada por receptores entre los que se encuentran los receptores acoplados a proteínas G (*G-protein coupled receptors*, GPCRs o GPRs) las cuales a su vez modulan positiva o negativamente la actividad de enzimas capaces de originar segundos mensajeros.

Los GPRs representan la mayor familia de proteínas de membrana en el genoma humano y constituyen una fuente de blancos para la industria farmacéutica (Lander y col., 2001; Venter y col., 2001). Los GPRs tienen una estructura que consiste en una cadena polipeptídica simple con siete segmentos  $\alpha$ -hélice transmembranales con una estructura tridimensional común (TM I-VII), estos dominios están unidos entre sí por asas polipeptídicas: tres intracelulares (i1-i3), el asa larga compuesta de aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 (asa i3) que es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, y tres asas extracelulares (e1-e3). Una cuarta asa citoplasmática puede formarse cuando el segmento C- terminal se une a la membrana por atracción lipídica a la cadena de aminoácidos, un segmento N-terminal glicosilado extracelular y el segmento C-terminal a nivel citoplasmático (Figura 4.1).



Tradicionalmente los GPRs han sido considerados como receptores para hormonas, neurotransmisores y otros mediadores, que se producen con el fin de llevar una señal que media la comunicación célula-célula. Sin embargo, este punto de vista fue cambiando a medida que se fueron identificando ligandos de distintas naturaleza. Estos ligandos incluyen moléculas que pueden ser además sustratos de energía (tales como ácidos grasos y sacarosa) o intermediarios metabólicos (tales como acetato, lactato o cuerpos cetónicos). Dentro de la familia de receptores GPRs, se encuentran los receptores de ácidos grasos de cadena corta: GPR43 (o *Free Fatty Acid receptor 2*, FFA2) y GPR41 (o *Free Fatty Acid receptor 3*, FFA3), cuyos ligandos específicos son acetato, propionato, butirato y pentanoato. Estudios *in vitro* han demostrado que el acetato activa preferentemente el GPR43, propionato el GPR43 y el GPR41 y el butirato se asocia preferentemente al GPR41, aunque también puede activar otros receptores (Schmidt y col., 2011; Blad y col., 2012). Algunos estudios recientes evidencian la importancia de estos receptores en la regulación de la respuesta inmune (Maslowski y col., 2009; Macia y col., 2015).

La expresión de GPR43 se extiende sobre el tracto gastrointestinal, células del sistema inmune y nervioso. En particular, las células enteroendócrinas en íleon y colon, expresan GPR43, motivo por el cual, al activarse por sus ligandos, ejercen un efecto anorexígeno (Kennedy y col., 2010; Tolhurst y col., 2012). Las células inmunes incluyendo eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos, células dendríticas, también expresan GPR43, siendo uno de los mecanismos a través de los cuales los AGCC modulan la respuesta inmune (Cox y col.,

2009; LePoul y col., 2013). Maslowski y col. (2009) demostraron que ratones que carecen del receptor GPR43, presentan una exacerbación de la inflamación en un modelo de colitis inducida por DSS, indicando la implicancia del receptor en el mecanismo antiinflamatorio.

El receptor GPR41 también se expresa la mucosa colónica y células enteroendócrinas, así como también se describe su expresión en algunas células inmunes y en adipocitos (Xiong y col., 2004; Kimura y col., 2011).

Otra familia de receptores asociados a proteína-G está formada por los llamados receptores de ácidos hidroxi-carboxílicos. Se ha descrito que el GPR81 (o *hidroxi carboxilic acid receptor 1*, HCA1) es un receptor que reconoce el lactato. También se encuentran en esta familia el GPR109A (HCA2) cuyos ligandos endógenos son niacina (vitamina B3) y 3-hidroxibutirato y GPR109B (HCA3) cuyo ligando principal es el 3-hidroxi octanoato.

El GPR109A se expresa en células inmunes incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y células de Langerhans de la epidermis, en el epitelio pigmentario de la retina, así como en el epitelio intestinal (Martin y col., 2009; Thangaraju y col., 2009; Yousefi y col., 2000; Schaub y col., 2001; Maciejewski-Lenoir y col., 2006). El GPR109B parece compartir con GPR109A su expresión en el tejido adiposo, así como en diversas células inmunes como monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Knowles y col., 2006; Ahmed y col., 2009a; Irukayama-Tomobe y col., 2009; Wanders y col., 2012). La activación de estos receptores también está relacionada con un efecto antilipolítico con la consecuente reducción de los niveles de ácidos grasos libres en plasma (Kang y col., 2011), aunque también se ha descrito una importante participación del receptor GPR109A en mecanismos antiinflamatorios a nivel intestinal (Thangaraju y col., 2009).

En particular el receptor específico para lactato, el GPR81, fue descrito principalmente en tejido adiposo y estudiado por su efecto antilipolítico y participación en el metabolismo energético de los adipocitos (Cai y col., 2008; Ge y col., 2008; Liu y col., 2009). La expresión del receptor GPR81 parece estar restringida a tejido adiposo, habiéndose encontrado en riñón, músculo esquelético e hígado con una menor expresión (Wise y col., 2003; Ge y col., 2008; Liu y col., 2009).

### 3. Control metabólico de la inflamación

Frente a los estímulos proinflamatorios, las células del sistema inmune incluyendo neutrófilos, células dendríticas, y macrófagos, reprograman su maquinaria metabólica, cambiando la fosforilación oxidativa hacia la glucólisis aeróbica, de manera similar al metabolismo de las células tumorales, conocido como “Efecto Warburg” (Garedew y col., 2010; Krawczyk y col., 2010). Esta reprogramación metabólica tiene como objetivo proveer



sustratos para la producción de mediadores lipídicos inflamatorios, potenciar la generación de especies reactivas de nitrógeno en caso de células mieloides y proveer mediadores para la síntesis de ácidos nucleicos en caso de células con capacidad proliferativa.

En condiciones normales y en presencia de oxígeno las células metabolizan la glucosa a través de la glucólisis hasta piruvato en el citoplasma. Luego el piruvato se transforma en acetil-CoA e ingresa a la mitocondria donde se lleva a cabo el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, el piruvato se convierte en lactato en el citoplasma por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La reprogramación metabólica que sufren las células inmunes tras la activación por un estímulo proinflamatorio determina que se genere energía fundamentalmente a partir de la glucólisis, aún en presencia de oxígeno, lo cual si bien rinde un menor número de moléculas de ATP por mol de glucosa, se generan con mayor velocidad y además se producen todos los intermediarios necesarios para la biosíntesis de las moléculas proinflamatorias. De este modo, disminuye el consumo de oxígeno y también la tasa de fosforilación oxidativa (Kelly & O'Neil, 2015).

La glucólisis es esencial para la respuesta inflamatoria en los macrófagos y células dendríticas. La reprogramación metabólica en estas células conduce en primer lugar a un mayor consumo de glucosa y a una mayor producción de lactato para regenerar el NAD<sup>+</sup> necesario para mantener la vía glicolítica activa. Además de acuerdo con esta observación, también se describió que cuando los macrófagos son activados por LPS, se produce un aumento en la expresión de enzimas vinculadas a la vía glicolítica y una disminución de la expresión de enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs (Ruiz-Garcia y col., 2011). De este modo se ha demostrado que la estimulación de macrófagos con LPS conduce a un aumento significativo en la concentración de lactato en medio extracelular, respecto a los controles sin estimular (Tannahill y col., 2013; Hoque y col., 2014, Kelly & O'Neil, 2015).



## OBJETIVOS

Considerando los mecanismos celulares que han sido descritos para los ácidos grasos de cadena corta, se planteó como objetivo de este capítulo estudiar el posible mecanismo subyacente a la actividad inmunomoduladora del lactato observada *in vitro* e *in vivo*.

### Objetivos específicos

- Evaluar el potencial rol del receptor GPR81 en la actividad anti-inflamatoria del lactato.
- Estudiar el efecto del lactato sobre la activación de la vía NF- $\kappa$ B en células de epitelio intestinal.
- Analizar el efecto de inhibidores de la vía glicolítica y de transportadores de lactato sobre la activación de la respuesta inmune innata inducida por flagelina en células epiteliales.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Detección de GPR81 en líneas celulares de epitelio intestinal y en tejidos humanos

Se evaluó la expresión del receptor GPR81 en líneas celulares de epitelio intestinal (Caco-2, HT-29), de epitelio gástrico (AGS), en biopsias de intestino humano y en tejido adiposo humano como control positivo, mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Las muestras de tejidos humanos utilizadas, fueron obtenidas a partir de pacientes sometidos a una operación de trasplante intestinal en el Hospital Universitario Fundación Favaloro (Buenos Aires, Argentina). Ninguna de ellas correspondió a tejidos infectados, inflamados, o neoplásicos. El protocolo aplicado para la obtención de las mismas fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Fundación Favaloro (DDI (984) 1207). Se obtuvo el ADNc de las líneas celulares como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 2. El tejido adiposo se utilizó como control positivo de la expresión de GPR81. Para ello, dos muestras de tejido adiposo conservadas en *RNA later* (Ambion, USA) fueron procesadas utilizando un ultraturrax y se extrajo ARN total utilizando un kit comercial Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare UK Limited Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA). La transcripción reversa y la PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 2. En esta oportunidad se utilizaron *primers* cuya secuencia se detalla en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1:** Secuencia de *primers* humanos utilizados para la determinación de la expresión del receptor GPR81 en líneas celulares y tejidos humanos.

<i>Primer</i>	<b>Secuencia 5'-3' (directo y reverso)</b>	<b>Referencia</b>
<b>GPR81</b>	ACT GGA ATT CGC CAC CAT GTA CAA CGG	Liu y col., 2009
	GTC GTG CTG CCG C	
	ACG TCA GCG GCC GCT CAG TGC CAC TCA	
	ACA TGT GGG GAT	

## 2. Determinación de AMP cíclico intracelular

La determinación de AMP cíclico (AMPc) intracelular fue realizada por personal del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET) bajo la dirección y colaboración del Dr. Martin Rumbo y Dr. Omar Pignataro. Para la determinación se realizó un ensayo donde se incubaron células Caco2 ccl20:luc en placas de 24 fosas con 500 µl de solución de lactato, acetato, propionato y butirato, 100 mM en DMEM base, durante 30 min. Luego se retiró el medio y se colocaron 500 µl de agua destilada por fosa para lisar los cultivos. Los lisados fueron transferidos a tubos Eppendorf y colocados a 90 °C durante 5 min para inactivar enzimas, luego se centrifugaron 5 min a 5000 xg. El AMPc fue cuantificado en estos sobrenadantes mediante radioinmunoensayos (Del Punta y col., 1996), desarrollados en el IBYME. Los resultados se expresaron como concentración media (pmol/100ml) relativa al control de células sin tratamiento de al menos tres experimentos independientes.

## 3. Ensayo con Toxina *pertussis*

Se analizó el efecto del tratamiento de los cultivos de células Caco-2 ccl20:luc con Toxina *Pertussis* (Ptx) sobre la capacidad del lactato y los ácidos grasos de cadena corta de modular la respuesta inmune innata inducida por flagelina. La toxina fue gentilmente cedida por personal del Laboratorio Vac-Sal del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET). Para ello una placa de 48 fosas de cultivo de células Caco-2 ccl20:luc fue incubada 16 h con toxina de *Bordetella pertussis* (100 ng/ml) en DMEM completo. Luego, el medio de cultivo fue retirado, y se colocaron 250 µl de solución de los diferentes ácidos orgánicos (neutralizadas y esterilizadas por filtración), 100 mM en DMEM base y se incubaron durante 30 min; luego se agregaron 12,5 µl de flagelina 20X. Finalmente, como en los ensayos descriptos previamente se midió luminiscencia luego de 5 h de incubación. Del mismo modo se incubaron las células con un análogo químico permeable del AMPc (dibutiril AMPc, 1mM) y se midió su efecto frente a la estimulación con flagelina.

## 4. Transfección de células de epitelio intestinal con lipofectamina 2000

Para evaluar si la vía de NF-kB está involucrada en la señalización, se generaron células Caco-2/TC-7 reporteras mediante transfección transiente con liposomas utilizando dos construcciones, la primera con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor 3kB, un promotor artificial que posee tres sitios de unión a NF-kB en tándem; la segunda construcción consiste en el gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de herpesvirus (HSV-Tk). Este sistema

reportero generado, permite evaluar la unión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y a su vez provee de una herramienta para normalizar las medidas de acuerdo al éxito de transfección en cada fosa de cultivo.

La transfección se realizó utilizando una leve modificación del protocolo comercial sugerido por el fabricante. Se trabajó con células Caco-2/TC-7 en placas de cultivo de 24 fosas al 80 % de confluencia para evitar la muerte celular debido a la duración del ensayo. Se utilizó 1  $\mu$ l de lipofectamina (LFM) por fosa y para una eficiente formación de complejos de transfección se utilizó 1  $\mu$ g de ADN por cada 2  $\mu$ l de LFM.

Para estimar la concentración de ADN se utilizó un espectrofotómetro con cubeta de cuarzo para medir la absorbancia a 260 nm. Se mezclaron los volúmenes necesarios para tener 0,5  $\mu$ g de ADN del plásmido con luciferasa de luciérnaga inducible con 0,5  $\mu$ g de ADN del plásmido con luciferasa de renilla constitutiva en medio OMEM (ver Apéndice) en una proporción 1:15.

Por separado se mezclaron 2  $\mu$ l de LFM por  $\mu$ g de ADN total utilizado con medio OMEM en una relación 1:15. Luego se mezclaron estas dos preparaciones y se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente se quitó el medio de cultivo de la placa de células, se lavaron con DMEM base 2 veces; se le agregó un volumen de OMEM a la mezcla y se colocaron 500  $\mu$ l de esta última preparación por fosa a transfectar. Se incubaron las células durante 8 h a 37 °C, en atmósfera controlada 5% CO<sub>2</sub>. Luego, se cambió el medio de cultivo por DMEM completo y se incubaron en las mismas condiciones durante un día. Es muy importante mantener las condiciones de esterilidad en los reactivos y materiales durante el proceso, debido a la prolongada duración del ensayo. Previo a la realización de los ensayos, se verificó la integridad celular por observación microscópica.

#### 4.1. Caracterización de las transfecciones

Se realizó el mismo formato de ensayo utilizado en el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc en placas de 24 fosas. Las células fueron preincubadas con 500  $\mu$ l de DMEM base adicionado de lactato 100 mM o bien con la misma cantidad de DMEM base durante 30 min 37 °C y atmósfera controlada 5 % CO<sub>2</sub>. La estimulación de las fosas correspondientes se llevó a cabo agregando 25  $\mu$ l por fosa de una suspensión 20X de flagelina en DMEM base. La flagelina fue previamente calentada a 60 °C durante 5 min para eliminar posibles agregados. Las células se incubaron 5 h en las condiciones mencionadas anteriormente. Finalmente se descartó el medio de cultivo y las células fueron lisadas con buffer de lisis según el protocolo del kit comercial Dual System Luciferase Assay (Promega, Madison WI, USA).

Para las medidas de luminiscencia se tomaron 10 µl del lisado celular y se mezclaron con 50 µl del sustrato LAR II. Se midió luminiscencia, la misma corresponde a la luciferasa inducible de luciérnaga. Luego, sobre la misma mezcla se agregaron 50 µl del sustrato para luciferasa de renilla en buffer Stop & Glo y se midió la luminiscencia no inducible, correspondiente a esta segunda enzima.

La luminiscencia se expresó de manera relativa al control interno con la luciferasa de expresión constitutiva en cada condición y luego se normalizaron los datos con respecto al control estimulado con flagelina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Luminiscencia relativa} = \frac{\text{Luminiscencia inducible}}{\text{Luminiscencia constitutiva}}$$

$$\text{Luminiscencia normalizada} = \frac{\text{Luminiscencia relativa promedio de la muestra}}{\text{Luminiscencia relativa prom. del control estimulado}}$$

#### 5. Efecto de inhibidores de la vía glicolítica, bloqueo de transportadores MCT en la activación de células Caco-2 ccl20:luc

Se estudió el efecto de los inhibidores de la vía glicolítica en la activación de células Caco-2 ccl20:luc inducida por flagelina. Se prepararon soluciones stock de los inhibidores en medio DMEM base: 2-desoxiglucosa (SIGMA-ALDRICH) 1 M; Oxamato de sodio (SIGMA-ALDRICH) 0,5 M y 3-bromopiruvato de sodio (SIGMA-ALDRICH) 0,1 M. Las células Caco-2 ccl20:luc fueron sembradas en placas de 96 fosas y utilizadas luego de 5 días de diferenciación. Se emplearon al mínimo 3 fosas para cada condición y los ensayos se realizaron por triplicado. Se incubaron las células con distintas concentraciones de los inhibidores durante 30 min, luego las fosas correspondientes se estimularon con flagelina (1 µg/ml) y se incubaron a 37 °C en estufa con atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>) durante 5 h. Al cabo de este tiempo, se retiró el medio de todas las fosas y se lisaron con 25 µl buffer de lisis del kit comercial ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega). Luego se midió la actividad luciferasa utilizando el kit ONE-Glo, la reacción se realizó mezclando 20 µl de lisado con 20 µl de reactivo conteniendo el sustrato de la enzima luciferasa, en placas blancas. Se midió luminiscencia dentro de los 30 min posteriores, en un luminómetro TriStar LB941 (Berthold Technologies) y los valores se normalizaron respecto a los controles de células sin tratamiento, estimuladas con flagelina, como se describió en la sección Materiales y Métodos del Capítulo 2.

Por otro lado se utilizó ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (α-CHC, SIGMA-Aldrich) que bloquea el transporte de ácidos carboxílicos en las células, en particular los transportadores MCT1 y MCT4 implicados en la entrada/salida de lactato. Para estos ensayos se preparó una



solución stock de  $\alpha$ -CHC 1 M en DMSO (SIGMA-Aldrich). Los ensayos se realizaron sobre cultivos de células Caco-2 ccl20:luc en placas de 96 fosas, siguiendo el protocolo recientemente descrito.

## 6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desvío estándar de al menos tres experimentos independientes. Para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples o Test de Dunnet para comparación de medias respecto a un control o bien Test t de Student para comparación entre dos medias. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (San Diego, California, EEUU).



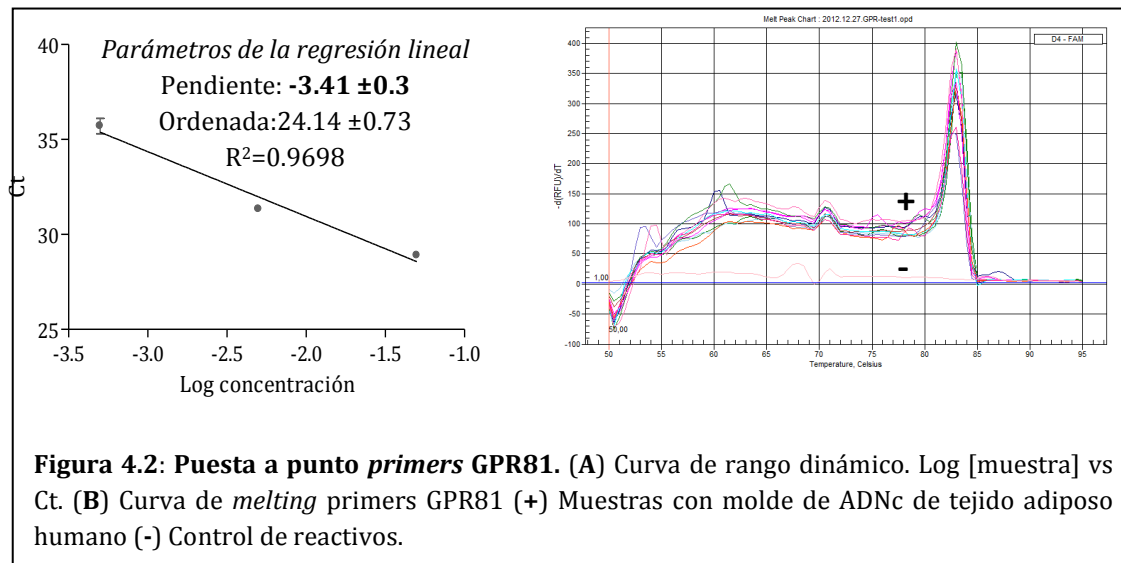
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Expresión del receptor GPR81 en líneas celulares de epitelio intestinal y tejidos humanos

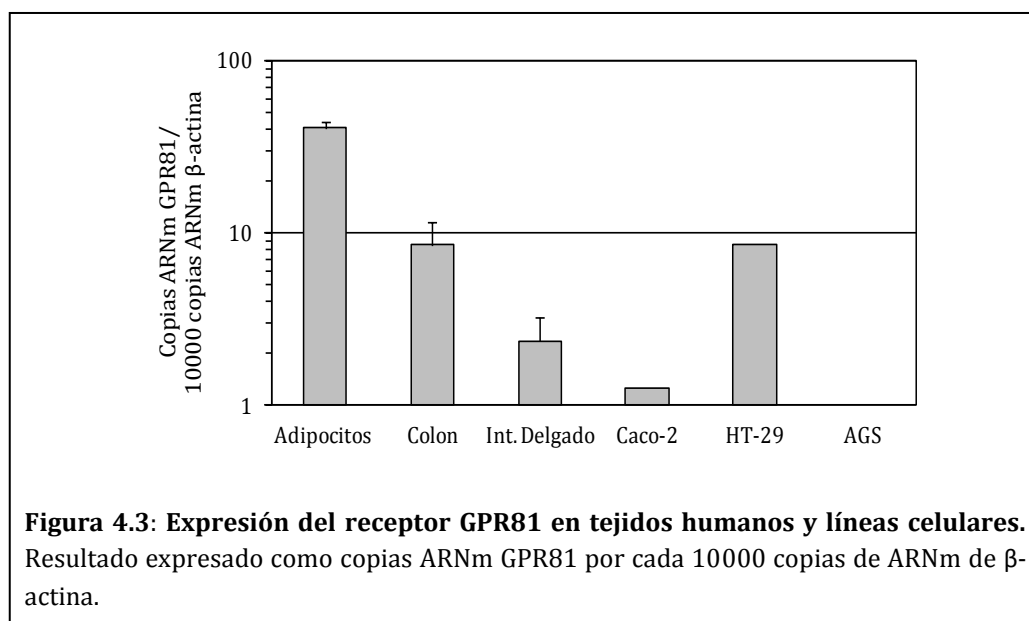
Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que son producidos en el colon por la microbiota intestinal pueden ejercer efectos antiinflamatorios a través de la activación de receptores específicos asociados a proteínas G (GPRs), en particular a los receptores GPR41, GPR43 y GPR109A (Maslowski y col., 2009; Tan y col., 2014; Macia y col., 2015). Por otro lado, el receptor GPR81, cuyo ligando es el lactato, ha sido descrito principalmente en adipocitos, mediando un efecto antilipolítico (Cai y col., 2008; Ahmed y col., 2009b). Teniendo en cuenta esta información y considerando el efecto modulador de la respuesta inmune innata ejercido por el lactato en células epiteliales evidenciado en el presente trabajo, se realizaron ensayos para analizar si el receptor GPR81 podría estar implicado en esta actividad.

En primer lugar se estudió la expresión del receptor GPR81 en las líneas celulares de epitelio intestinal (Caco-2 y HT-29), en biopsias humanas de intestino delgado y colon y en una línea celular de epitelio gástrico (AGS). Se utilizó tejido adiposo humano como control de expresión positiva y se emplearon *primers* específicos obtenidos a partir de referencias en literatura (Liu y col., 2009). Se extrajo ARN total de las líneas celulares y tejidos como se detalló en la sección Materiales y Métodos, se realizó una transcripción reversa (RT-PCR) y una vez obtenido el ADN complementario (ADNc) se realizó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para detectar la expresión del receptor. Se utilizó  $\beta$ -actina como gen normalizador. Se corroboraron las condiciones de reacción para los *primers* específicos para GPR81 utilizando como molde ADNc obtenido de tejido adiposo. Se realizó una curva de rango dinámico, donde se analizaron los valores de Ct obtenidos para distintas concentraciones de muestra con una concentración de *primers* de 1  $\mu$ M (Figura 4.2 A). Se realizó una regresión lineal con los valores de la curva obtenida y se calcularon los parámetros de la misma. La pendiente experimental obtenida tuvo un valor de  $-3,41 \pm 0,3$ , lo cual corresponde a una eficiencia de aproximadamente 100 %. También se verificó la temperatura de fusión de los productos de amplificación obtenidos (*T melting*), en la cual se observó un producto único y de igual  $T_m$  en todos los pocillos donde se colocó muestra de

ADNc y primers GPR81 y no en el control de los reactivos, por lo que no se observó formación de dímeros de *primers* (Figura 4.2 B).



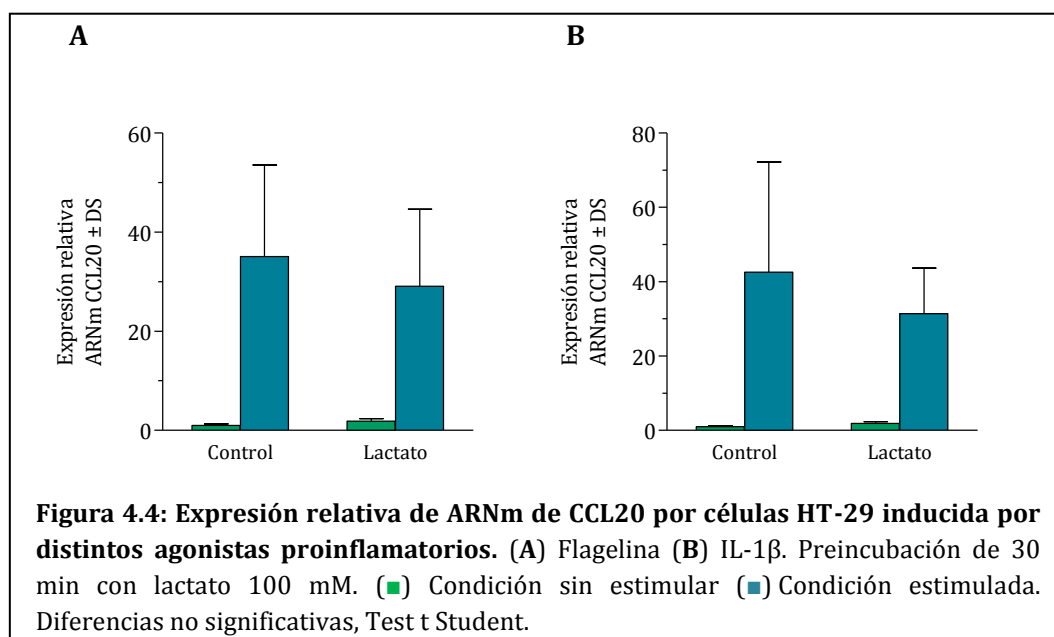
Luego de la verificación de las condiciones de reacción para los *primers* específicos, se analizó la expresión del receptor en las muestras de intestino delgado y colon humano y en las líneas celulares de epitelio intestinal Caco-2 y HT-29, y de epitelio gástrico (AGS). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3.



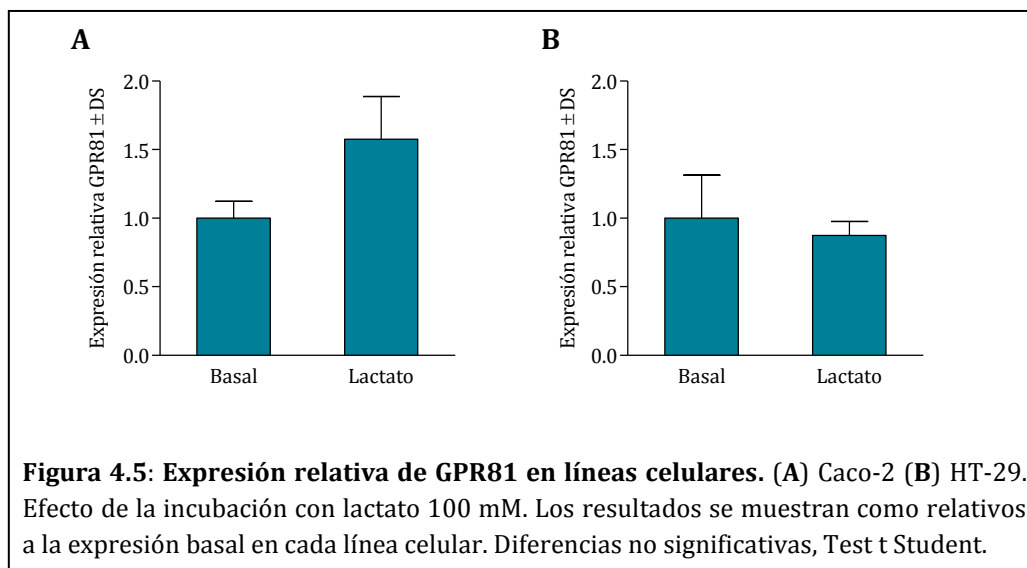
Se observó que el receptor GPR81 se expresa en el tejido adiposo tal como se esperaba, mientras que no se detectó en la línea celular de epitelio gástrico (Figura 4.2). Sin embargo y como resultado relevante se detectó que este receptor se expresa en tejido intestinal humano y en las líneas celulares de epitelio. De esta forma, estando presente el receptor específico de lactato, la modulación de la expresión de CCL20 evidenciada en células Caco-2 ccl20:luc o dicho de otra forma, los efectos antiinflamatorios de lactato a nivel intestinal, podrían ser mediados por la interacción del lactato con este receptor.

## 2. Modulación de la respuesta inmune innata epitelial por lactato en distintas líneas celulares

A fin de corroborar si el lactato ejercía su efecto mediado por la interacción con el receptor GPR81 se utilizó la línea HT-29, la cual presentó una expresión del receptor significativamente mayor que en las otras muestras analizadas. Se determinó la expresión de ARNm de la citoquina CCL20 mediante qRT-PCR, en cultivo de células HT-29 preincubadas o no con lactato durante 30 min y luego estimuladas con flagelina o IL-1 $\beta$ , durante 2 h, obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 4.4.



Como puede verse en la Figura 4.4, la preincubación de células HT-29 con lactato 100 mM no afectó la expresión del mensajero CCL20 inducida por flagelina e IL-1 $\beta$ , es decir que la respuesta de esta línea celular no fue modulada por lactato. A continuación se estudió si la presencia del lactato era capaz de estimular la expresión del receptor GPR81 en células Caco-2 y HT-29 (Figura 4.5).



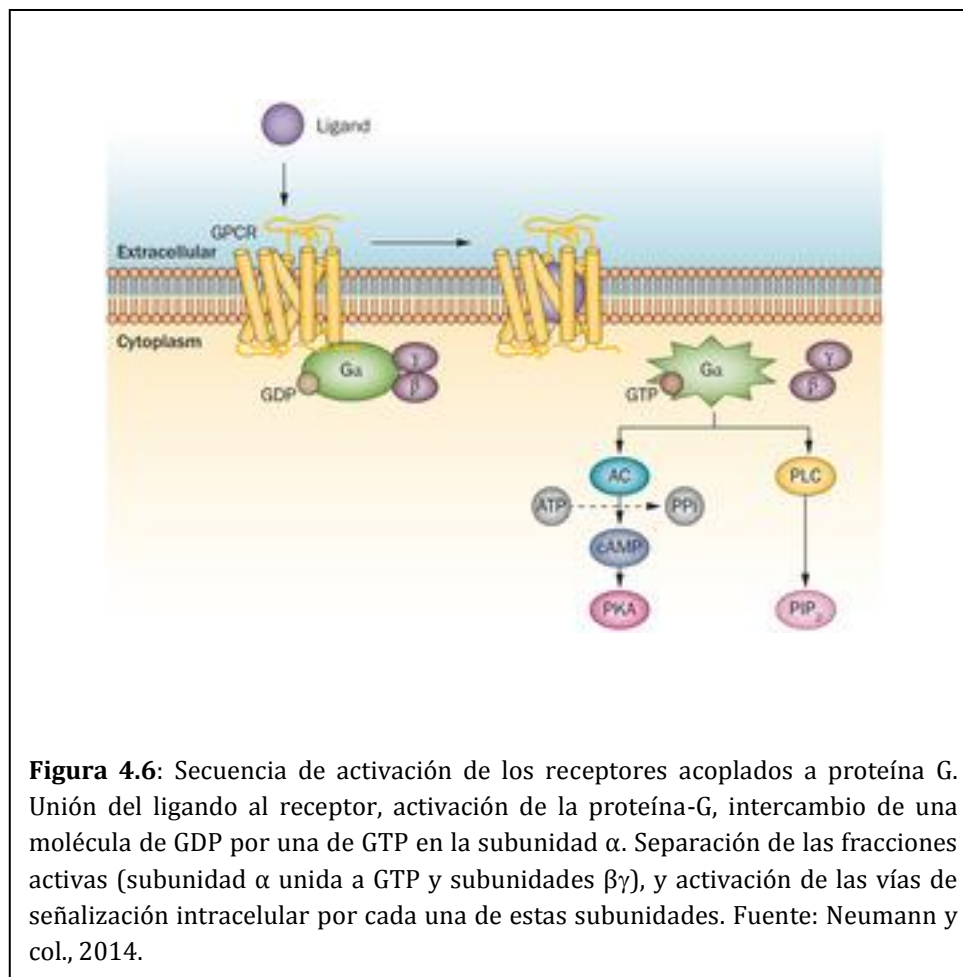
Como puede observarse en la Figura 4.5, la expresión de GPR81 en las células Caco-2 y HT-29 que recibieron tratamiento con lactato no presentó diferencias significativas respecto a la expresión basal, por lo que puede concluirse que el tratamiento con lactato no afecta la expresión del receptor GPR81 y por tanto el lactato no modula ni induce su expresión en las líneas epiteliales intestinales estudiadas. Corte Osorio y col. (2011) describieron la expresión del receptor GPR43 en el colon de ratas y observaron que el consumo de una dieta rica en fibra dietética (5% de fibra) aumentó significativamente la expresión de este receptor. Esto demostró que el gen del receptor GPR43 puede ser inducible en cuanto a su expresión por factores dietéticos, especialmente si se aumenta la concentración de AGCC producidos por la fermentación microbiana de la fibra. Sin embargo en este trabajo la presencia de lactato no indujo un aumento en la expresión del receptor contribuyendo a la evidencia que el efecto observado no estaría relacionado con el mismo.

### 3. Evaluación del rol del receptor GPR81 en el efecto inmunomodulador del lactato: Determinación de AMPc intracelular y ensayo con toxina pertussis

Los receptores asociados a proteínas G, una vez que son activados por un ligando, se pueden acoplar a cuatro familias diferentes de proteínas G heterotriméricas y producir un efecto particular sobre una vía de señalización intracelular, la cual requiere de una estructura específica de las asas citoplasmáticas y de la región C-terminal de los GPRs.

Estas "proteínas G" son un trímero de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  (conocidas como  $G\alpha$ ,  $G\beta$ , y  $G\gamma$  respectivamente), que se sitúan en la membrana plasmática a través de su subunidad  $\alpha$ ,

mediante uniones hidrofóbicas. En su estado inactivo se enlazan reversiblemente a un guanosín difosfato (GDP) unido a la subunidad  $\alpha$  y se vuelven activas cuando se unen a un guanosín trifosfato (GTP). Cuando el ligando se une al receptor, se activa alostéricamente la proteína G al facilitar el intercambio de una molécula de GDP por una de GTP en la subunidad  $\alpha$ . La célula mantiene una relación 10:1 de GTP:GDP citosólica, así el intercambio por un GTP está asegurado. En este punto, las subunidades de la proteína G se disocian del receptor, así como entre ellos, para producir un monómero  $G\alpha$ -GTP y un dímero  $G\beta\gamma$ , que ahora son libres para modular la actividad de otras proteínas intracelulares. La hidrólisis de  $G\alpha$ -GTP regenera la subunidad  $G\alpha$ -GDP, permitiendo la reasociación con el dímero  $G\beta\gamma$ , adquiriendo la configuración de partida, formando una proteína G "inactiva", que a su vez puede nuevamente unirse a un GPR y esperar la activación (Figura 4.6).



Se han caracterizado distintos tipos de enzimas efectoras capaces de ser activadas por proteínas G:

- Adenilato Ciclasa (AC), es la enzima que cataliza el ciclamiento del ATP (substrato) para originar AMP cíclico (AMPc), que es la molécula con actividad de segundo mensajero, capaz de activar a la proteína quinasa A (PKA) en su ruta de transducción.

- Fosfolipasa C (PLC), es la enzima generadora de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), los cuales tienen la característica de actuar como segundos mensajeros. Así, el DAG, que queda unido a la membrana, es capaz de activar a la proteína-quinasa C (PKC), la cual, de forma análoga a la PKA es capaz de modular por procesos de fosforilación la actividad de muchas proteínas, ya sean de membrana, citosólicas o factores de transcripción. Mientras que el IP3, que es soluble en el citoplasma, mediante su interacción con canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tetraméricos, situados fundamentalmente en el retículo endoplásmico, puede incrementar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico de 10 a 1000 veces, activando la función de varias proteínas que son dependientes de él.

- Fosfolipasa A2 (PLA2).- enzima generadora de ácido araquidónico (AA), el cual es capaz de activar a la proteína quinasa C (PKC) en su ruta de transducción.

La subunidad  $G_{\alpha}$ -GTP libre puede interactuar con efectores como la adenilato ciclasa y fosfolipasas en la membrana citoplasmática; mientras que el complejo  $\beta\gamma$  puede activar canales iónicos u otros efectores, así como también pueden tener efectores independientes de proteína G. Los efectores de la proteína  $G_{\alpha}$ , pueden clasificarse en los grupos que se muestran en la Tabla 4.2.

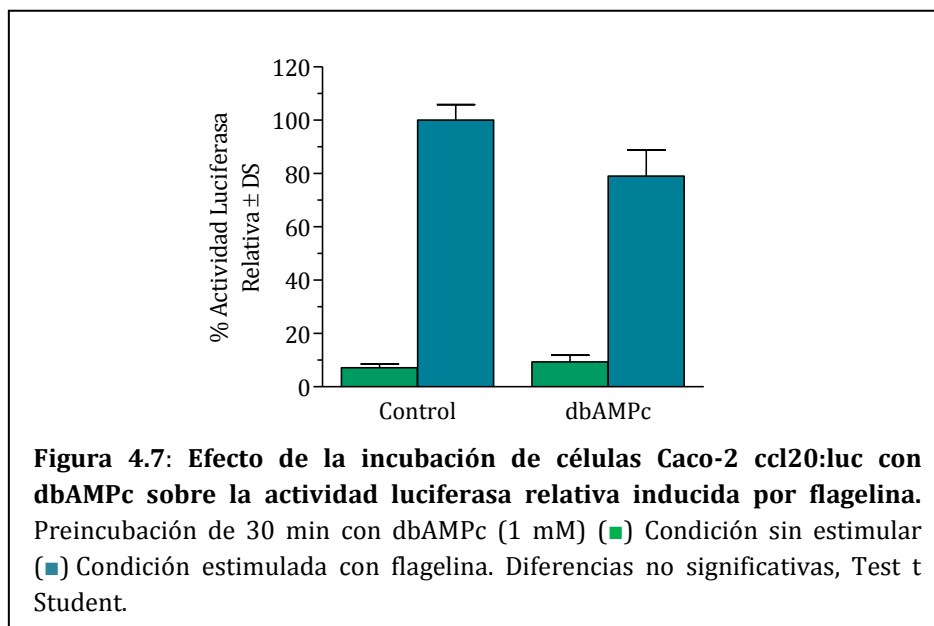
**Tabla 4.2:** Clasificación de proteína G según su efector asociado.

Clase $G_{\alpha}$	Efector asociado	Segundo mensajero
$G_{\alpha s}$	Adenilato ciclasa	$\uparrow$ AMPc
$G_{\alpha i/o}$	Adenilato ciclasa, canal de $\text{K}^{+}$	$\downarrow$ AMPc, cambia el potencial de membrana
$G_{\alpha q/11}$	Fosfolipasa C	$\uparrow$ IP <sub>3</sub> , DAG, $\text{Ca}^{+2}$ intracelular
$G_{\alpha 12/13}$	Fosfolipasa C	$\uparrow$ IP <sub>3</sub> , DAG, $\text{Ca}^{+2}$ intracelular

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico, IP<sub>3</sub>: Inositol 1,4,5-trifosfato, DAG: diacilglicerol.

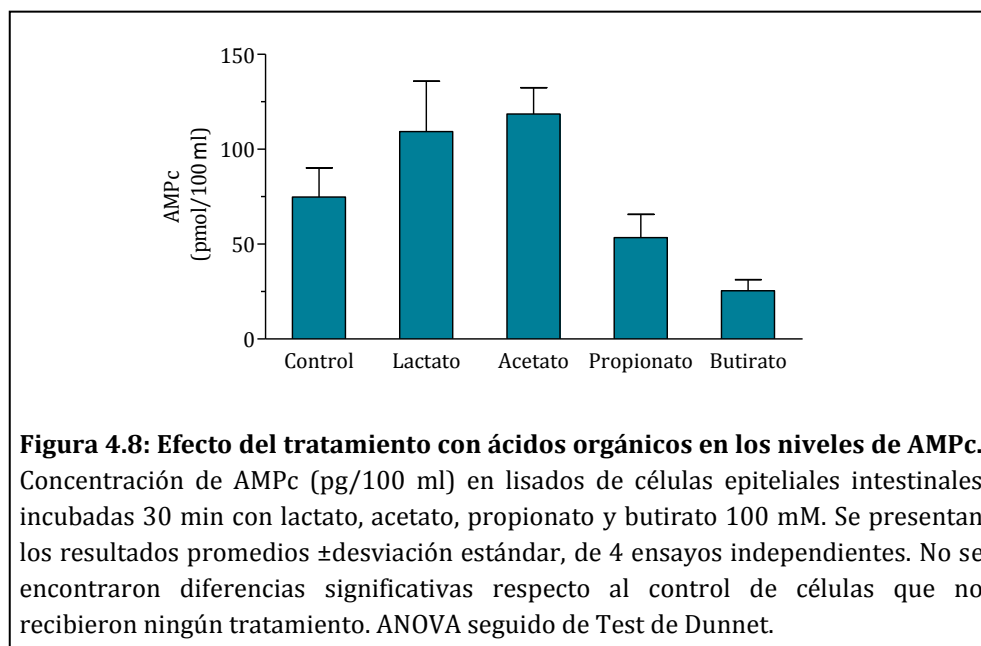
Teniendo en cuenta que los GPRs pueden estar asociados a proteínas G estimuladoras o inhibitorias, con el consecuente cambio en los niveles intracelulares de AMPc, se evaluó si el aumento intracelular de esta sustancia participaba en la modulación producida por lactato al estimular las células Caco-2 ccl20:luc con flagelina. Para ello se realizó un ensayo de estimulación en presencia de dibutilil AMP cíclico (dbAMPc) que es un análogo químico capaz de ingresar a las células.





Como se observa en la Figura 4.7, la incubación de células Caco-2 ccl20:luc con dbAMPc no modificó significativamente el aumento de la actividad luciferasa inducida por flagelina. Es decir que el aumento de la concentración de AMPc intracelular, no estaría actuando como mensajero del efecto ejercido por los ácidos carboxílicos estudiados. Estos resultados inducen a pensar que el efecto del lactato no estaría mediado por un receptor asociado a una proteína  $G_{\alpha s}$ .

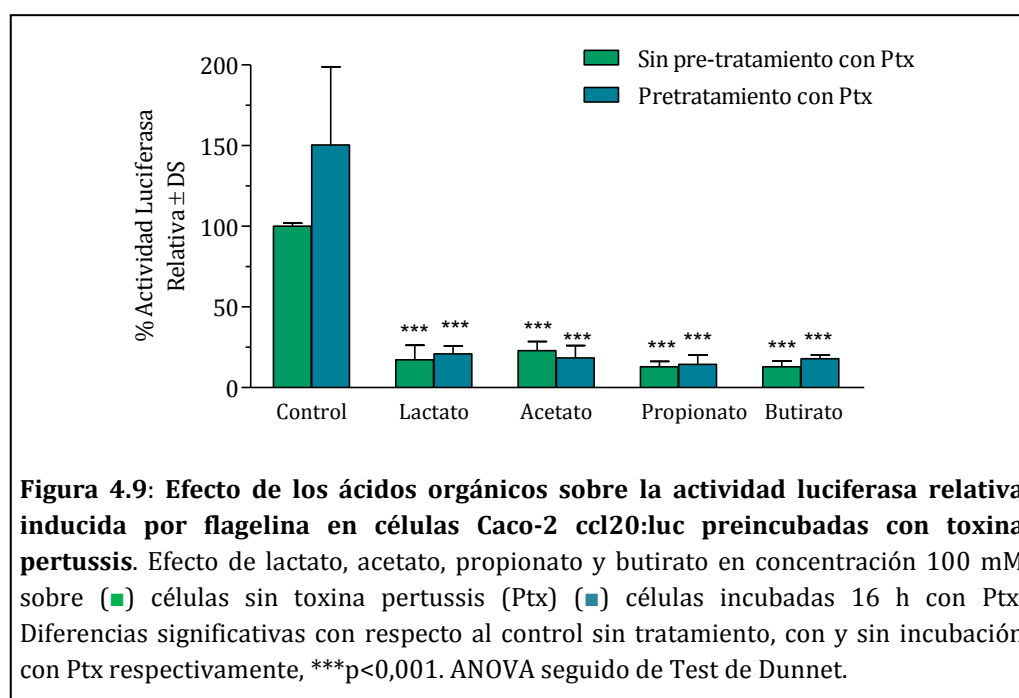
Para evaluar si el efecto del lactato se encuentra mediado por la activación del receptor GPR81, el cual se asocia a una proteína  $G_{\alpha i}$  (Offermanns, 2014), produciendo la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, se determinaron las variaciones en los niveles de AMPc intracelular. Para ello se utilizó un cultivo de células Caco-2 ccl20:luc, que fueron incubadas con soluciones de lactato 100 mM. Se utilizaron también otros ácidos orgánicos como acetato, propionato y butirato a fin de comparar los resultados. Se realizó la determinación de AMPc mediante radioinmunoensayos en el sobrenadante. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.8.



Como puede verse en la Figura 4.8 el tratamiento con lactato y los AGCC no afectó significativamente los niveles de AMPc intracelular. Contrariamente, trabajos previos han descrito que los receptores GPR43, GPR41, GPR81, GPR109A y GPR109B se encuentran asociados a proteína  $G_{ai}$  y su activación produce una disminución del AMPc intracelular (Brown y col., 2003; Le Poul y col., 2003; Cai y col., 2008; Ge y col., 2008; Liu y col., 2009; Offemanns, 2014). Sin embargo, otros autores destacan que la regulación de la señalización de los GPRs es muy compleja y demuestran que podría ocurrir también a través de vías independientes de proteínas G (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Defea, 2008; Kang y col., 2014).

Algunas toxinas bacterianas han constituido una herramienta de gran utilidad para el estudio de los GPRs, ya que las mismas afectan las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G. La toxina pertussis, es una proteína producida por la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta toxina, se fija a la membrana de las células, penetra y, utilizando el  $NAD^+$  del citoplasma celular, produce la ADP-ribosilación de una proteína  $G_{ai}$ , hecho que conduce a la falta de interacción entre el receptor y la proteína efectora y por tanto a la ausencia de señalización por esta vía. Es decir, bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa (García Sáinz y col., 1996).

Se analizó el efecto de la preincubación de células Caco-2 ccl20:luc durante 16 h con toxina pertussis (Ptx) y luego se evaluó el efecto del lactato, acetato, propionato y butirato en la activación inducida por flagelina. Se compararon los resultados entre células que fueron pre-tratadas o no con la toxina (Figura 4.9).



Como puede observarse en la Figura 4.9 el efecto modulador de la activación de la respuesta innata tanto de lactato, como de acetato, propionato y butirato, no se perdió por la preincubación de las células con la toxina. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por otros autores para el lactato en células mieloides (Hoque y col., 2014) así como también para el efecto del butirato en células dendríticas (Arpaia y col., 2013), en ambos casos el tratamiento de las células con Ptx no inhibió el efecto biológico estudiado.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en el epitelio intestinal el efecto de los ácidos estudiados no estaría mediado, al menos, por una proteína  $G_{\alpha i}$  asociada al receptor, ni por perturbaciones de la concentración de AMPc intracelular. Sin embargo no puede descartarse la importancia de dichos receptores, ya que se conoce que los mismos pueden mediar mecanismos reguladores de la respuesta inmune de manera independiente de proteínas G.

Si bien la vía de señalización clásica de los GPRs implica la activación de las proteínas G, se ha hecho evidente que también pueden activar mecanismos de señalización intracelulares sin requerir acoplamiento a una proteína G. La señalización de manera independiente de proteína G incluye proteínas de la familia de las arrestinas. La activación del receptor promueve la translocación de las arrestinas desde el citoplasma a la membrana celular y su interacción con el receptor activado produce el desacople de sus proteínas G y conduce a su internalización, que finalmente atenúa la señalización (Claing y col., 2002; Gao y col., 2004).

Las arrestinas pueden ejercer efectos opuestos tanto como sinérgicos respecto a la señalización vía proteína-G; o bien activar una misma enzima pero a través de diferentes mecanismos.

Teniendo en cuenta estos resultados, y con la finalidad de evaluar el efecto del lactato sobre células del sistema inmune se trabajó en colaboración con miembros del grupo de investigación dirigido por el Dr. Martin Rumbo perteneciente al Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP, UNLP-CONICET) y se estudió *in vitro* el efecto del lactato, acetato, propionato y butirato en células relevantes para la respuesta inmune innata del tracto gastrointestinal. Se encontró que el lactato y los AGCC (acetato, butirato y propionato) modularon la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-12 por macrófagos derivados de médula ósea y peritoneales de ratón. También se observó una disminución de la expresión del marcador de superficie CD40 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón activados con LPS, de manera dosis-dependiente (Iraporda y col., 2015). Tal como fue evidenciado en los ensayos realizados sobre cultivos de células epiteliales, presentados en el Capítulo 2.B, las concentraciones efectivas de los ácidos carboxílicos resultaron diferentes. Del mismo modo a lo obtenido en ensayos sobre células epiteliales, butirato y propionato fueron eficaces en concentraciones de 1 a 5 mM mientras que los efectos moduladores de acetato y lactato fueron ejercidos con concentraciones superiores a 20 y 50 mM respectivamente. Es importante destacar que, el tratamiento sólo con lactato o AGCC, no alteró la expresión o producción de estos factores proinflamatorios. Además, utilizando células derivadas de ratones deficientes de GPR81 (Ahmed y col., 2010) se encontró que el lactato moduló la respuesta proinflamatoria inducida por LPS tanto en macrófagos derivados de médula ósea de ratones salvajes como de ratones deficientes del receptor.

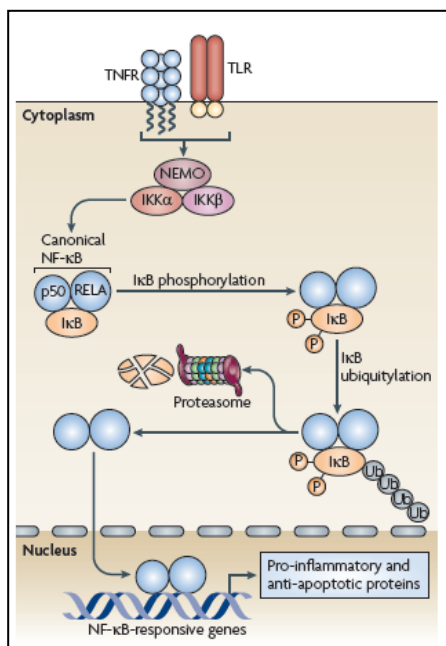
Los resultados descriptos sobre el mecanismo del lactato en la regulación de la inflamación no están aún dilucidados. Hoque y col. (2014) centraron su investigación en macrófagos/monocitos, que se encuentran involucrados críticamente en la inflamación de hígado y páncreas y utilizaron modelos *in vitro* e *in vivo*, para probar que el lactato ejerce un efecto anti-inflamatorio mediado por el receptor GPR81. En contraste con lo obtenido en este estudio, describieron que el efecto del lactato en la modulación de la respuesta proinflamatoria en macrófagos de ratón y humanos estimulados por LPS es dependiente del receptor GPR81, realizando experimentos de pérdida de función mediante siRNA específico para GPR81. Los autores encontraron que la administración de lactato 15 mM redujo la lesión de órganos en ambos modelos de inflamación, mediante la unión a GPR81 y que también sería dependiente de la proteína adaptadora  $\beta$ -arrestina 2. Por otra parte, a través

de esta vía de señalización, demostraron que el lactato inhibe directamente la activación de NF- $\kappa$ B, con un efecto beneficioso sobre la gravedad de la enfermedad en ambos modelos. Por otro lado, Lee y col. (2013) demostraron que la activación del receptor GPR43 por sus agonistas conduce a la reducción de la translocación del factor NF- $\kappa$ B al núcleo, modulando la expresión de genes de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 $\beta$ .

#### 4. Efecto del lactato en la activación del factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B)

Uno de los factores de transcripción centrales que media las respuestas inflamatorias es el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), que se requiere para la activación transcripcional de muchos efectores pro-inflamatorios, incluyendo CCL20, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, Cox2, iNOS. La familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B se compone de cinco miembros (subunidades), p50, p52, p65 (RelA), c-Rel y RelB (Hayden & Ghosh, 2008) que en la mayoría de las células forman dímeros que residen principalmente en el citoplasma en forma inactiva debido a que se encuentran asociados con un inhibidor específico I $\kappa$ B el cual está constituido por la familia de proteínas inhibidoras (I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  y I $\kappa$ B $\epsilon$ ) o a las proteínas p100 y p105 precursoras (Hayden & Ghosh, 2008).

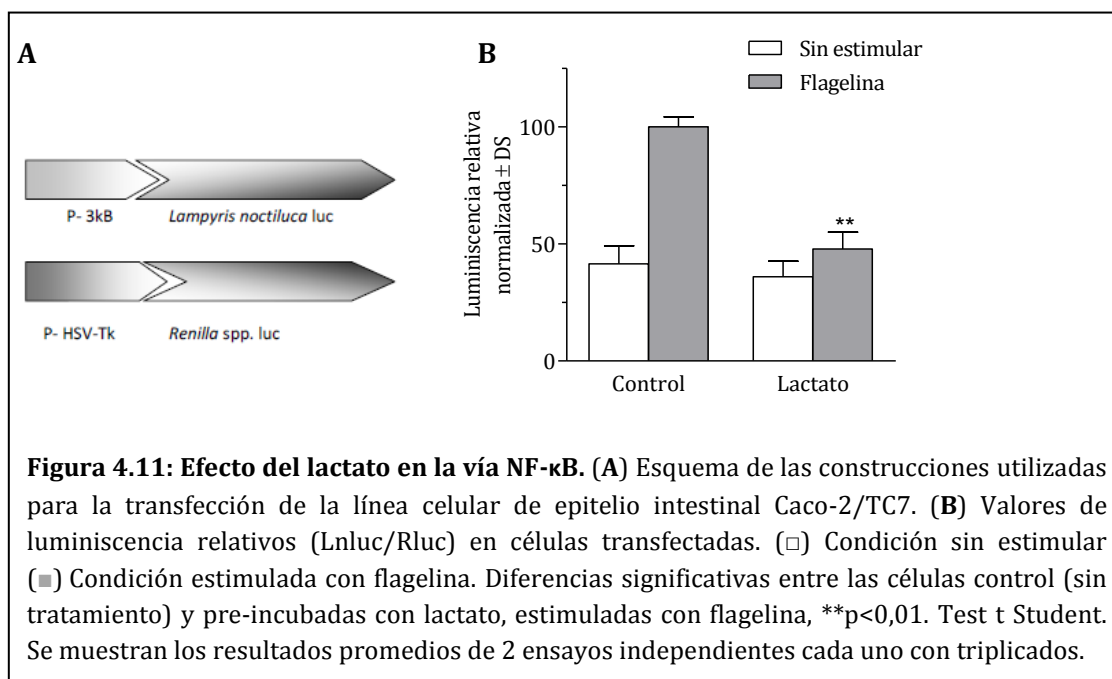
La activación de los TLR por sus respectivos ligandos, produce un cambio conformacional de los mismos que genera una señalización a través del reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares como las quinasas asociadas al receptor de IL-1 (*interleukin-1 receptor associated kinase*, IRAK: IRAK4, IRAK1). La activación de IRAK conduce a una cascada de reacciones que activan complejo quinasa IKKB (complejo IKK/NEMO, IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ ) el cual fosforila el complejo I $\kappa$ B $\alpha$  y lo dirige hacia su degradación proteosomal (Hayden & Ghosh, 2008; Wang y col., 2001). La degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , permite la traslocación de NF- $\kappa$ B desde el citoplasma al núcleo donde promueve la expresión de genes citoquinas pro-inflamatorias y además del gen que sintetiza I $\kappa$ B, evento de gran importancia pues es el asa de autorregulación negativa que bloquea la cascada molecular de la síntesis de citoquinas una vez erradicada la infección (Figura 4.10).



**Figura 4.10:** Representación esquemática de la activación de la vía NF-κB. Los dímeros NF-κB se encuentran en el citoplasma asociados a las proteínas inhibidoras (IκB). Los estímulos pro-inflamatorios estimulan los receptores TNFR o IL-1/TLR los cuales desencadenan la activación del complejo IκB quinasa (IKK). Este complejo fosforila al inhibidor IκB en sitios específicos disparando su ubiquitinación (poliUB) y posterior degradación en proteasoma. La eliminación de las proteínas inhibidoras permite la acumulación de dímeros NF-κB en el núcleo, donde estimularán la traducción de genes principalmente con función proinflamatoria y antiapoptótica. NEMO: NF-κB Essential Modulator. Fuente: Pasparakis, 2009.

En el intestino, la activación de NF-κB puede tener un papel dual: perjudicial y/o beneficioso. Por un lado, la activación de la vía NF-κB contribuye al desarrollo y mantenimiento de la inflamación intestinal y se encontró que es más activa en células de la mucosa de pacientes que sufren de enfermedades inflamatorias intestinales. Además se observó que la inhibición farmacológica de la vía NF-κB atenúa la inflamación intestinal en modelos murinos de colitis (Schreiber y col., 1998). Así como la activación excesiva NF-κB puede contribuir a la inflamación intestinal, su inhibición podría tener efectos terapéuticos en las enfermedades inflamatorias intestinales.

Para evaluar si la vía de NF-κB está involucrada en el efecto modulador del lactato se generaron células Caco-2/TC-7 reporteras mediante transfección transiente con liposomas utilizando dos construcciones, la primera con el gen reportero luciferasa de luciérnaga bajo el dominio del promotor artificial 3kB, que posee tres sitios de unión a NF-κB en tándem; la segunda construcción consiste en el gen reportero luciferasa de *Renilla* spp. bajo el dominio del promotor constitutivo Timidina quinasa de herpesvirus (HSV-Tk). Este sistema reportero generado, permite evaluar la unión del factor de transcripción NF-κB al promotor y a su vez provee de una herramienta para normalizar las medidas de acuerdo al éxito de transfección en cada fosa de cultivo mediante el gen reportero de luciferasa de *Renilla* spp.



En la Figura 4.11 se puede apreciar que la estimulación de las células por flagelina conlleva a un aumento significativo de la actividad relativa de luciferasa de luciérnaga (dependiente de NF-κB) y que la preincubación con lactato conduce a una modulación de esta respuesta. Esto permite concluir que la vía de NF-κB es modulada por lactato.

Esta observación coincide con lo descrito por otros autores en células mieloides. Watanabe y col. (2009) informaron que el ácido láctico así como también el medio de cultivo de una cepa de *Lactobacillus casei* Shirota, presentaron la capacidad de disminuir la lesión intestinal inducida por indometacina, y además demostraron que el lactato 10 mM inhibe la vía NF-κB en células mieloides THP-1. Hoque y col. (2014) también informaron que esta vía es inhibida por lactato en macrófagos humanos y de ratón. Sin embargo, otros autores han reportado que el lactato potencia el efecto del LPS en macrófagos activando la vía NF-κB (Nareika y col., 2005; Samuvel y col., 2009).

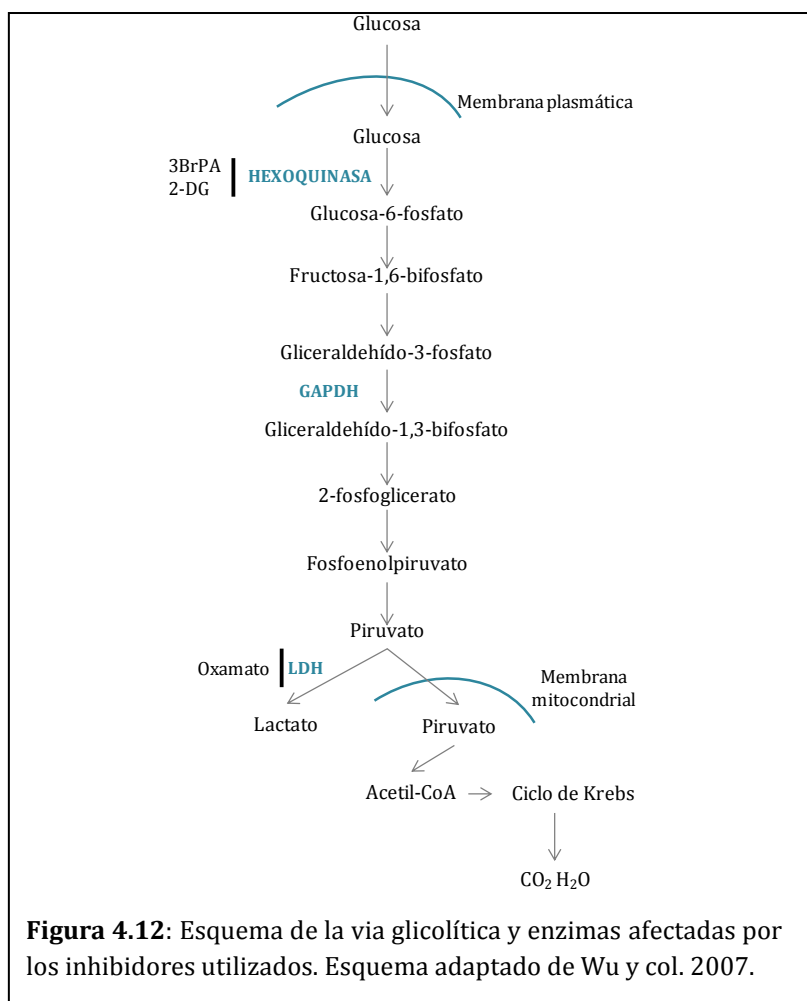
## 5. Efecto de los inhibidores de la vía glicolítica y bloqueo de transportadores de lactato sobre la activación de células epiteliales

La investigación reciente ha comenzado a caracterizar las alteraciones metabólicas que ocurren en las células inmunes y cómo la reprogramación metabólica facilita cambios en el destino de las células y la función durante el curso de una respuesta inmune. Las células inmunes activadas tienden a adoptar una forma de metabolismo llamado “glucólisis aeróbica” mediante el cual la glucosa es metabolizada a lactato pesar de la abundancia de

oxígeno. Este tipo de metabolismo permite el uso de glucosa para generar energía y apoyar los procesos de biosíntesis (Donnelly & Finlay, 2015). Las células con un fenotipo glucolítico presentan tasas significativamente más altas de producción de protones y por tanto de acidificación extracelular que las células que utilizan la fosforilación oxidativa. Krawczyk y col. (2010) describieron que la estimulación de células dendríticas con ligandos de TLR4 y TLR2 provoca un aumento del consumo de glucosa y de la tasa glicolítica, promueve la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT 1) tanto a nivel de ARNm como de proteína y observaron una mayor producción de lactato. Kelly & O'Neil (2015) también describieron este fenómeno de reprogramación metabólica en macrófagos y células dendríticas activadas por estímulos proinflamatorios, disminuyendo la fosforilación oxidativa y favoreciendo la glicólisis. Esta evidencia nos condujo a realizar ensayos para aproximarnos a analizar el efecto sobre el metabolismo de células de epitelio intestinal frente a la estimulación con agonistas proinflamatorios. En colaboración con el grupo de investigación del IIFP (CONICET, UNLP) dirigido por el Dr. Martin Rumbo y del Instituto Pasteur de Lille (Francia) dirigido por el Dr. Jean-Claude Sirard se analizó el efecto de distintos inhibidores de la vía glicolítica sobre la respuesta inflamatoria inducida por flagelina en la línea reportera Caco-2 ccl20:luc.

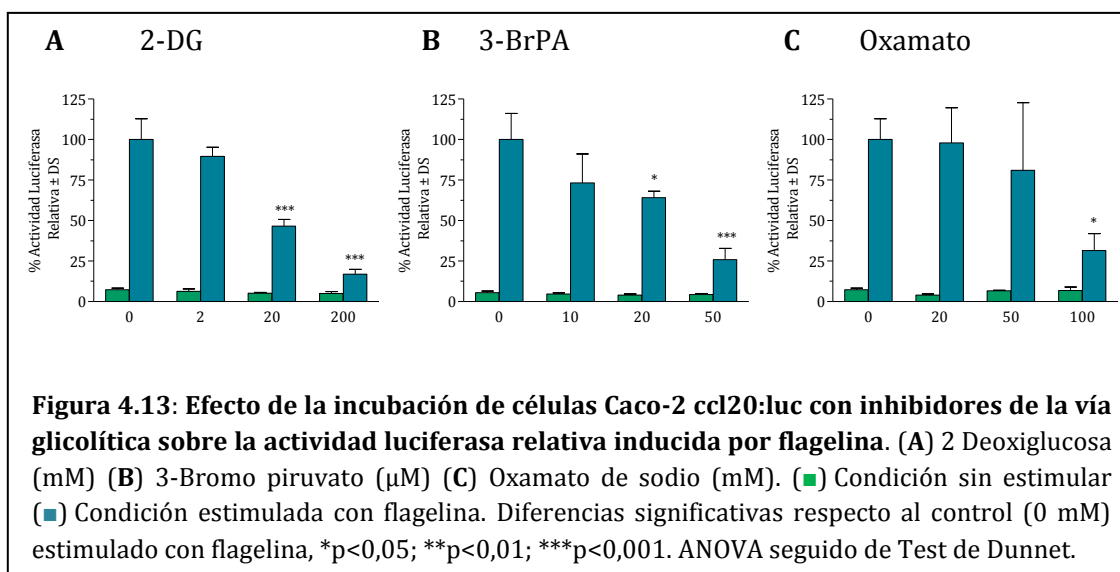
En la Figura 4.12 se presenta un esquema de la vía de la glicólisis y las enzimas blanco de los inhibidores utilizados en este estudio.





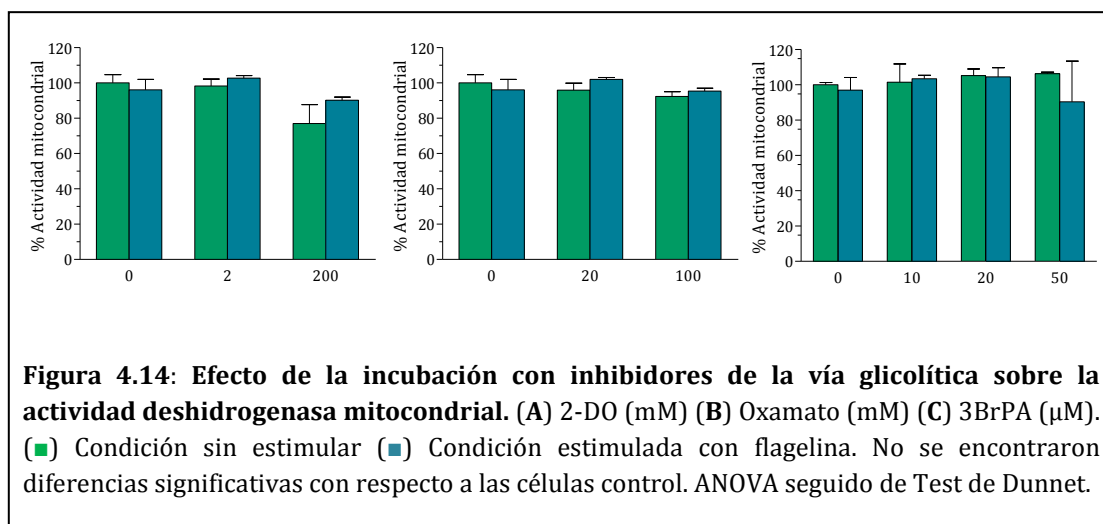
- **2-desoxiglucosa (2-DG)**, actúa como un inhibidor alostérico de la hexoquinasa en el primer paso de la glicólisis.
- **3-bromo piruvato (3-BrPA)**, es un análogo halogenado del ácido pirúvico. Este compuesto puede actuar como inhibidor de varias enzimas en los distintos pasos de la glicólisis, entre ellas la hexoquinasa.
- **Oxamato de sodio (oxa)**, es un inhibidor de la enzima lactato deshidrogenasa.

Para estos ensayos, se incubaron las células con distintas concentraciones de los inhibidores, se estimularon con flagelina y se incubaron durante 5 h. Luego, se determinó la actividad luciferasa inducida y se normalizaron los valores respecto a los controles de células estimuladas con flagelina que no recibieron tratamiento (Figura 4.13).

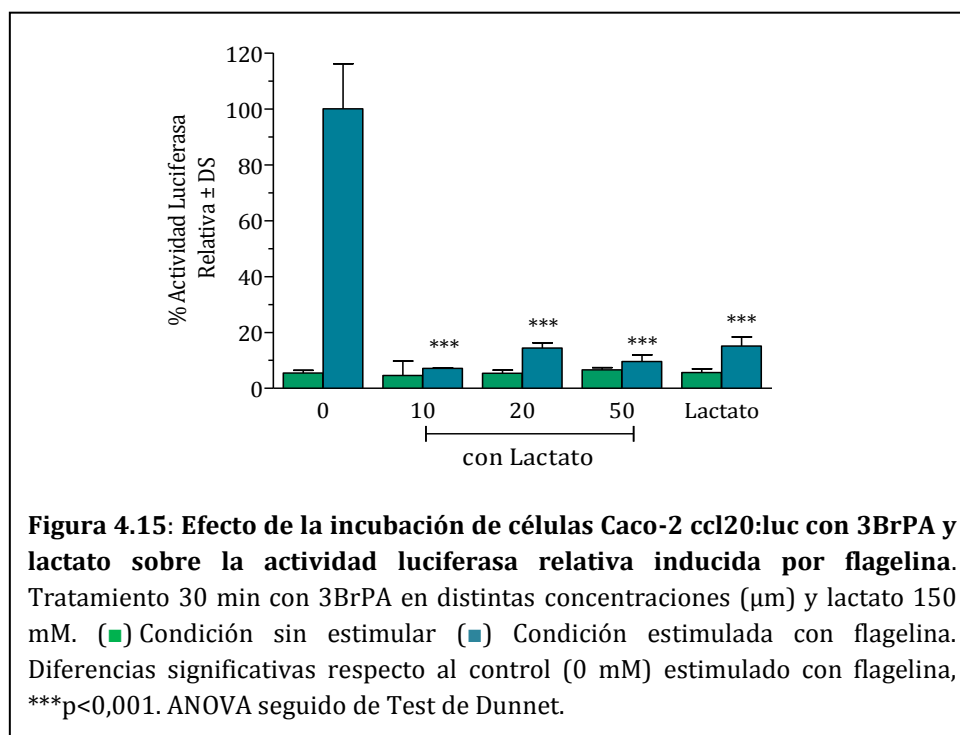


Como puede verse en la Figura 4.13 A y B, la alteración de la vía glicolítica por la inhibición de la enzima hexoquinasa por 2DG o 3BrPA, conduce a una menor activación de las células epiteliales. Además, la inhibición de la enzima LDH por oxamato produjo el mismo efecto (Figura 4.13 C). La acción de los inhibidores fue dosis-dependiente.

La determinación de la medida de la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial (Materiales y Métodos Capítulo 2) permitió evidenciar que ninguna de las condiciones de incubación con los inhibidores glicolíticos resultó citotóxica (Figura 4.14).

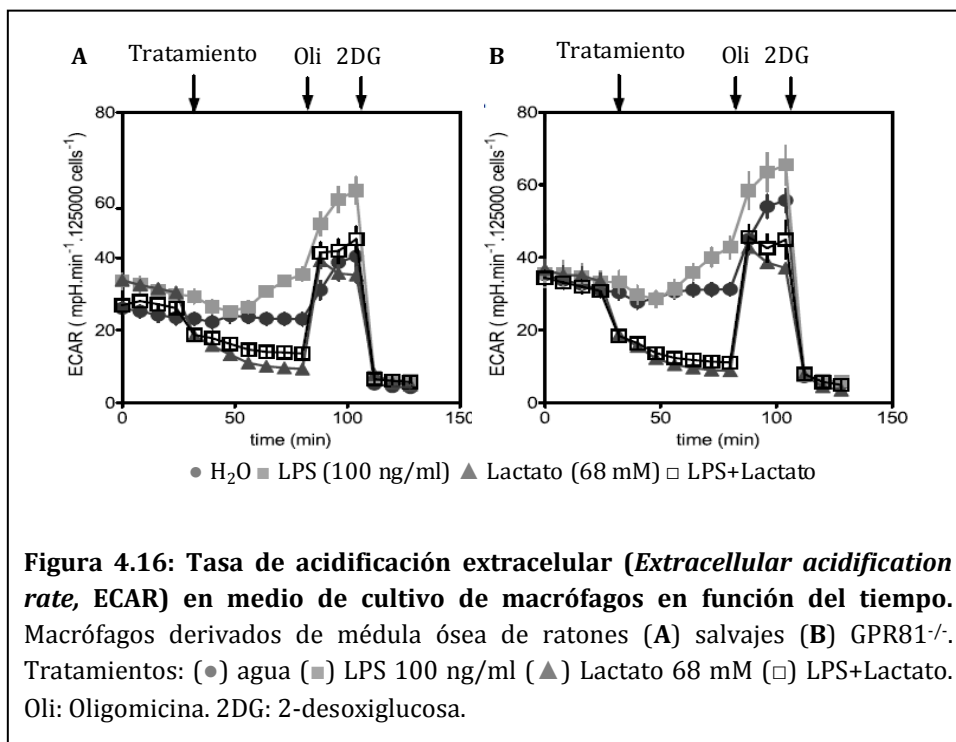


Cuando se realizó el ensayo en células Caco-2 ccl20:luc incubadas en presencia de 3BrPA y lactato y estimuladas con flagelina, se observó que el efecto inmunomodulador fue independiente de la dosis de inhibidor y equivalente la ejercida por el lactato (Figura 4.15).



Los resultados obtenidos por incubación de células con 3BrPA y lactato, indicarían que el efecto inmunomodulador se debe a la interacción/ingreso del lactato a la célula, donde ejercería alguna modificación en la utilización de sustratos y el metabolismo o de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria.

Los cambios en el metabolismo, se pueden detectar simultáneamente a través de equipamientos que miden la tasa de consumo de oxígeno (*Oxygen Consumption Rate*, OCR), para cuantificar la respiración mitocondrial, y de la tasa de acidificación extracelular (*Extracellular Acidification Rate*, ECAR), la cual es un indicador de la tasa de glucólisis. Mediante la determinación de ECAR en función del tiempo y en el marco del trabajo de colaboración, se analizó la alteración del metabolismo celular de macrófagos frente al agregado de lactato, utilizándose macrófagos derivados de médula ósea de ratones salvajes y de ratones deficientes de GPR81 (GPR81<sup>-/-</sup>) como modelo experimental (Figura 4.16) (ver Apéndice).

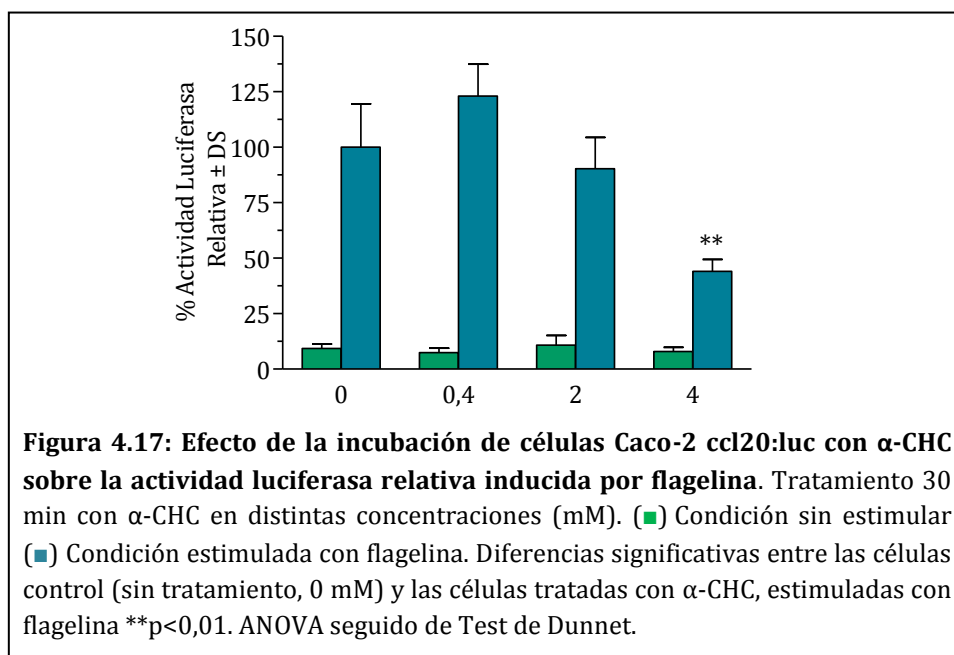


La medida de ECAR es directamente una medida de la velocidad de glicólisis. En la Figura 4.16 se observa la tasa de acidificación del medio celular en presencia de LPS y/o lactato la cual refleja la modificación del tipo de metabolismo que desarrolla la célula. En estos experimentos se realizó un tratamiento secuencial con un inhibidor de la respiración celular como la oligomicina (Oli), que genera un aumento en la glucólisis y 2-desoxiglucosa (2-DG) que es fosforilado a fosfo-2-DG (P-2-DG) en el primer paso de la glucólisis, pero no puede ser metabolizado adicionalmente por en el siguiente paso y por tanto actúa como un inhibidor de la vía glicolítica. En el gráfico puede verse que en los controles (agua), tanto en células derivadas de ratones salvajes como deficientes del receptor GPR81, la velocidad de glicólisis no se modifica. Cuando se añade oligomicina, se produce un aumento significativo en la velocidad de glicólisis y luego con el agregado de 2-DG este parámetro disminuye. La estimulación de los macrófagos provenientes de ambos ratones con LPS (100 ng/ml) genera un aumento de la velocidad de glicólisis y repite el comportamiento del control frente al agregado de ambos inhibidores. La observación importante en estos ensayos fue que el tratamiento con lactato en medio extracelular disminuyó la velocidad de glicólisis de las células sin estimular y también frente al estímulo con LPS. De este modo puede concluirse que el agregado de lactato en el medio podría estar generando una reprogramación metabólica celular que altera la respuesta-inflamatoria. Además el hecho de que se haya observado este mismo comportamiento tanto en células derivadas de ratones salvajes como

deficientes del receptor GPR81, contribuiría a demostrar que el receptor no estaría involucrado en el efecto observado.

La “glucólisis aeróbica” fue normalmente descrita en células tumorales, aunque este mecanismo también desempeña un papel crítico en la activación y el rápido crecimiento de células inmunes. Este fenómeno conduce en todos los casos a una mayor formación de lactato intracelular que se exporta a través de los transportadores de ácidos carboxílicos (*Monocarboxylate transporter*, MCT). Hasta la fecha se han identificado 14 transportadores; sin embargo, sólo siete isoformas se han caracterizado funcionalmente (Halestrap & Meredith, 2004; Murakami y col., 2005). Estas isoformas difieren en cuanto a la distribución en los tejidos, especificidades de sustrato, y las afinidades, además sólo cuatro isoformas (MCT1, MCT2, MCT3 y MCT4) fueron caracterizados como transportadores acoplados al transporte de protones (Halestrap & Meredith, 2004; Bonen y col., 2006). MCT1 se expresa de forma ubicua en los tejidos humanos, el MCT2 tiene una distribución más restringida, con mayor expresión observada en testículo (Lin y col., 1998) y en epitelio gástrico en hámsters (Kekuda y col., 2013). La expresión de MCT3 está más restringida a la membrana basolateral del epitelio de la retina (Philp y col., 2003), sin embargo, algunos estudios han demostrado la expresión de ARNm de MCT3 en líneas celulares del músculo liso, aorta humana (Zhu y col., 2005) y en la membrana basolateral de íleon humano (Gill y col., 2005). MCT4, está estrechamente relacionado con MCT1 en términos de distribución y regulación, se expresa predominantemente en células que tienen una alta tasa glicolítica (tales como células tumorales, musculares e inmunes), donde está implicado en la eliminación del lactato producido a partir de la glucólisis (Juel & Halestrap, 1999; Manning Fox y col., 2000). Se ha demostrado que se expresa en intestino delgado de ratón (Dimmer y col., 2000) tanto en las vellosidades como en la membrana basolateral (Kirat y col., 2006). En particular en células inmunes se estudian los transportadores MCT1 y MCT4. En células de epitelio intestinal se describen MCT1, MCT3 y MCT4 (Hadjigapiou y col., 2000; Lecona y col., 2008), mientras que algunos autores también describen la expresión de MCT2 en la línea Caco-2 (Lam y col., 2010). MCT4 y MCT1 en colon transportan el lactato y butirato (Cuff y col., 2002; Kekuda y col., 2013).

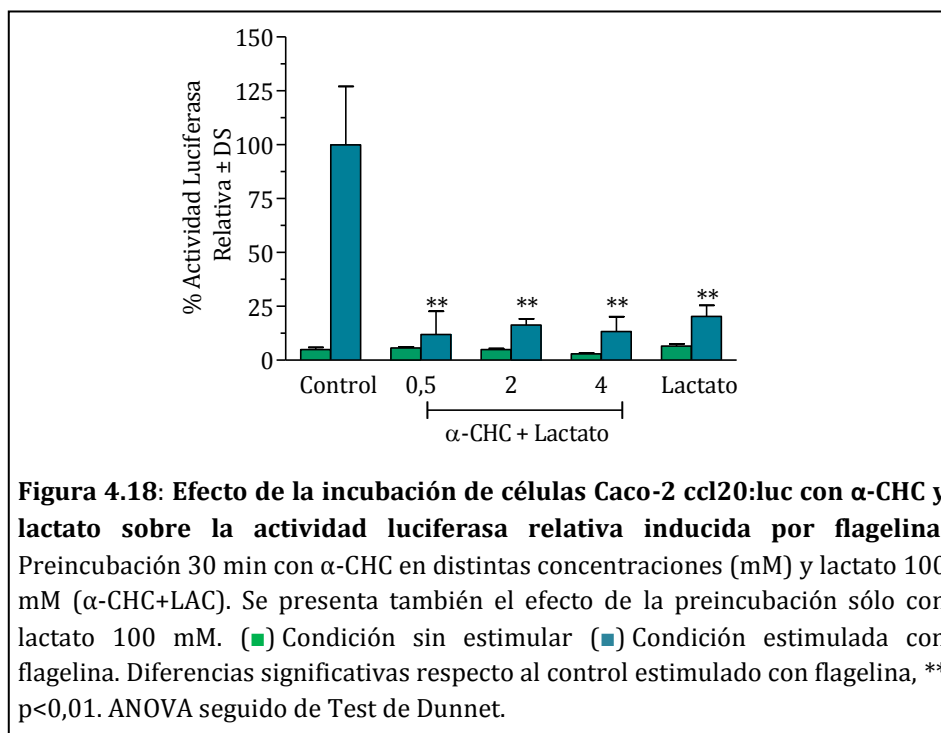
A fin de analizar el rol de estos transportadores en la activación por flagelina de las células Caco-2 ccl20:luc se incubaron las células con ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHC), el cual es un inhibidor de los transportadores MCT1 y MCT4.



A medida que el lactato es generado en el citoplasma, se transporta hacia el exterior de la célula mediante MCT 1 o MCT4 acoplado al transporte de protones, a favor de su gradiente de concentración. En la Figura 4.17 se observa que al bloquear el transporte de lactato por  $\alpha$ -CHC, en concentración 4 mM, se produce una disminución de la respuesta inducida por flagelina medida como reducción de la actividad luciferasa en casi un 50 %. Al impedir la salida de lactato, este metabolito se acumularía en el interior de la célula produciendo una disminución de la activación de la respuesta inflamatoria.

Tan y col. (2015) demostraron que la expresión del transportador MCT4 en macrófagos está regulada por agonistas de los receptores TLR2 y TLR4 y es mediada por la proteína MYD88 de manera dependiente de NF- $\kappa$ B y macrófagos en los que se eliminó el MCT4 presentaron una expresión atenuada de los mediadores proinflamatorios. Estos resultados, al igual que los obtenidos en ese trabajo en células epiteliales, demuestran que la inhibición de la salida de lactato de la célula limita su activación.

Luego, se realizó un ensayo incubando las células con el inhibidor de MCT ( $\alpha$ -CHC) y lactato en el medio extracelular. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.18.



Como puede verse en la Figura 4.18, aún en presencia del inhibidor del transportador, el lactato tiene un efecto modulador de la respuesta inflamatoria en las células epiteliales. Lam y col. (2010) describieron que existe una disminución significativa de la absorción de D-lactato por células Caco-2 pre-incubadas con  $\alpha$ -CHC, lo cual demuestra la participación de los MCTs en este proceso. Este hecho podría ser un indicio de que el lactato no necesita ingresar a la célula para ejercer su efecto, sino que lo haría por ejemplo, a través de algún receptor externo que no fue considerado en este estudio.

Sin embargo, tampoco se podría descartar que el lactato pueda ser internalizado por otro transportador que no se bloquea por  $\alpha$ -CHC o que la elevada concentración de lactato en el medio extracelular podría estar impidiendo la salida del mismo y por tanto producir su acumulación en el interior de la célula.

Del análisis de los posibles mecanismos implicados en la actividad biológica del lactato llevados a cabo en el presente capítulo, se concluye que los efectos inmunomoduladores ejercidos por el lactato en células epiteliales serían independientes del receptor GPR81 y podrían estar relacionados con la modulación de las vías metabólicas.





## CONCLUSIONES

- Se detectó el receptor GPR81 en las líneas celulares de epitelio intestinal Caco-2 y HT-29 y en tejido intestinal humano.
- El lactato no ejerció modulación de la expresión de ARNm de CCL20 inducida por IL-1 $\beta$  y flagelina en cultivos de células HT-29.
- La expresión del receptor GPR81 en las líneas celulares Caco-2 y HT-29 no se afectó por la incubación con lactato.
- El efecto modulador de la respuesta inmune innata de células epiteliales observado para acetato, propionato y butirato, no estaría mediado por una proteína G $\alpha_i$ , dado que su actividad no fue inhibida por el pre-tratamiento con toxina pertussis.
- La vía NF- $\kappa$ B fue activada por flagelina e inhibida por lactato 100 mM en células de epitelio intestinal.
- La estimulación de macrófagos con LPS produjo un aumento de la velocidad de glicólisis, la cual fue reducida por el tratamiento con lactato.
- La inhibición de la vía glicolítica condujo a una disminución de la activación de la respuesta inmune de células Caco-2 ccl20:luc por flagelina. Además la modulación de la respuesta inflamatoria ejercida por el lactato se produjo aún en presencia de 3BrPA.
- El bloqueo de transportadores de lactato en células Caco-2 ccl20:luc, disminuyó la activación de la respuesta inflamatoria inducida por flagelina.



# Conclusiones generales

---

## CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo se orientó al estudio de la actividad biológica de la fracción no microbiana de leches fermentadas artesanales. El kefir constituye una valiosa fuente de bacterias y levaduras cuyas capacidades probióticas han sido estudiadas por miembros de nuestro grupo de investigación. Sin embargo, la actividad biológica del producto puede estar asociada también a los metabolitos que son producidos durante la fermentación. En el presente estudio se utilizaron gránulos de kefir pertenecientes a la colección del CIDCA, de diferentes orígenes: CIDCA AGK1 y CIDCA AGK10 los cuales no presentaron diferencias significativas en la cantidad de bacterias lácticas y levaduras presentes. El kefir se preparó por fermentación de leche descremada comercial, a 20 °C y los productos obtenidos con ambos gránulos alcanzaron un pH cercano a 4 en 24 h, siendo el ácido láctico y acético los principales productos de la fermentación. La concentración de los mismos aumentó con el tiempo de fermentación alcanzando a las 24 h una concentración de láctico y acético de 92,5 mM y 4,3 mM, respectivamente, para el gránulo AGK1 y de 86,2 mM y 4,6 mM para el gránulo AGK10. Luego de 48 h de fermentación las concentraciones de ácido láctico y acético fueron de 147,7 mM y 9,8 mM (gránulos AGK1) y 125,4 mM y 11,3 mM (gránulos AGK10). Se aisló y se cuantificó el exopolisacárido de las leches fermentadas encontrándose en una concentración de alrededor de 220 mg/l, sin detectarse diferencias significativas entre los tiempos de fermentación ensayados, ni entre los gránulos de kefir. Además, se observó que luego de 24 h de fermentación a 20 °C se consume un 20 % de la lactosa inicial de la leche.

Como aproximación del grado de hidrólisis de proteínas lácteas, se evaluó el aumento de nitrógeno TCA soluble en los productos fermentados, el perfil electroforético y cromatográfico de las leches fermentadas y de la fracción no microbiana de kefir. Mediante estas técnicas no se evidenció una proteólisis significativa en los productos obtenidos luego de 24 y 48 h de fermentación con gránulos de kefir a 20 °C. Sin embargo, si la fermentación se extiende por 7 o 21 días se detectó la hidrólisis de caseínas y de  $\alpha$ -lactoalbúmina. Otros autores han descripto la aparición de numerosos péptidos derivados de las proteínas lácteas por la acción de microorganismos del kefir, que podrían contribuir a las propiedades benéficas del producto. Cuando estas muestras fueron sometidas a un tratamiento de digestión enzimática, simulando el pasaje a través del tracto

gastrointestinal, los perfiles peptídicos obtenidos por RP-HPLC no presentaron diferencias, indicando que la fermentación de leche con gránulos de kefir no modifica la susceptibilidad a la hidrólisis por las enzimas digestivas.

Se obtuvo la **fracción no microbiana de kefir** y se caracterizó su actividad biológica. En cuanto a la **acción antimicrobiana**, se observó mediante ensayos *in vitro*, que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos Gram-positivos como *Bacillus cereus* y Gram-negativos como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, los cuales son contaminantes frecuentes de alimentos. Esta propiedad se pierde al neutralizar la fracción no microbiana inclusive cuando se concentra 5 veces, indicando que los ácidos orgánicos en su forma no disociada serían los responsables de este efecto.

La incubación de *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis con la fracción no microbiana de kefir disminuyó su capacidad invasiva a células de epitelio intestinal en cultivo, mientras que la incubación de las células con esta fracción no fue capaz de proteger a enterocitos de la adhesión e invasión de *Salmonella* Enteritidis.

La fracción no microbiana de kefir presentó la **capacidad de modular la respuesta inmune innata epitelial** en modelos *in vitro*. El pretratamiento de células Caco-2 ccl20:luc con la fracción no microbiana disminuyó la actividad luciferasa inducida por diversos agonistas de la respuesta inmune innata (flagelina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Asimismo, redujo significativamente la expresión de marcadores proinflamatorios a nivel transcripcional (CCL20, IL-8, CXCL2, CXCL10), inducidos por flagelina, sin afectar la expresión de constituyentes celulares que no están involucrados en la respuesta inflamatoria (LPH, ITF, MIF). La capacidad inmunomoduladora se mantuvo luego de un tratamiento térmico y se perdió por diálisis permitiendo concluir que el lactato posee un rol protagónico en dicha propiedad.

Otros metabolitos de fermentación microbiana, como acetato, propionato y butirato, también ejercieron un efecto modulador de la respuesta inmune innata inducida por flagelina, en forma dosis-dependiente. El propionato y el butirato redujeron la actividad luciferasa a partir de una concentración de 1 mM, mientras que el lactato y el acetato requirieron concentraciones superiores.

La administración de lactato en agua de bebida a ratones no ejerció protección frente a la inflamación intestinal aguda inducida por TNBS/etanol. Sin embargo, cuando se administró lactato en forma intrarrectal, se observó una reducción significativa del daño epitelial y de la inflamación. El hecho de que la administración de lactato en forma oral no ejerza un efecto protector en el modelo de colitis estudiado, podría atribuirse a que el

lactato no se encuentra en el colon en una concentración suficiente por haber sido absorbido y/o consumido por las bacterias colónicas.

En cuanto a los mecanismos asociados a la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata epitelial del lactato observada en ensayos *in vitro* e *in vivo*, se pudo concluir que si bien se detectó la expresión de un receptor específico de lactato (GPR81) en epitelio intestinal, el efecto ejercido por el lactato podría ser independiente del mismo. Por otro lado se determinó que el efecto inmunomodulador del lactato podría estar vinculado con la modulación de las vías metabólicas. El aumento de la concentración de lactato extracelular a nivel del colon podría generar un cambio en el metabolismo de las células que implique una disminución de la tasa de glicólisis que afecta la normal activación de células epiteliales y mieloides frente a estímulos proinflamatorios.

El ácido láctico es uno de los principales metabolitos de la fermentación de leche por bacterias lácticas, además puede encontrarse como componente de muchos otros productos fermentados y también es generado *in situ* por la microbiota intestinal. Los efectos asociados al lactato demostrados en este trabajo de tesis conducen a enfatizar la formulación de alimentos que promuevan la generación de este ácido en el colon por la microbiota. Asimismo, la utilización de cepas de microorganismos probióticos con capacidad de adherirse al epitelio y producir este metabolito *in situ*, podría contribuir a los efectos descritos.

El lactato como propio componente alimenticio o como un metabolito generado *in situ* en la mucosa intestinal puede contribuir a la promoción de la salud y debe ser valorizado. Elucidar los mecanismos responsables de la bioactividad de lactato en diferentes tipos celulares podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para manejar problemas críticos de salud tales como las enfermedades inflamatorias intestinales.



# Apéndice

---



## APÉNDICE

### 1. Medios de cultivo celular

#### **Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), High glucose, Gibco, Grand Island, N.Y., USA.**

Suero fetal bovino Inactivado (PAA)	180 ml
Aminoácidos no esenciales (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA)	13 ml
Penicilina/ Streptomycin (1000 IU/ml, 1000 µg/ml)	13 ml
Gentamicina (50 mg/ml) Parafarm, aportiti SACIFIA, Buenos Aires, Argentina	10 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g/l
Agua farmacológica	c.s.p 1 l

pH = 7,0 ±0,2

El suero fetal bovino se inactiva 30 min a 60 °C. Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

#### **Medio DMEM base**

Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM), Gibco, Grand Island, N.Y., USA	1000 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g/l

pH = 7,0 ±0,2

Una vez preparado, el medio se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0,22 µm.

#### **OMEM (Opti-MEM) Gibco BRL Life technologies, Rockville, MD, USA.**

Opti-MEM®	1000 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2,4 g/l

## 2. Electroforesis SDS-PAGE

### 2.1. Soluciones Stock

- *Acrilamida – bisacrilamida 30,8 %*

Acrilamida 30,0 g

Methylene bis acrilamida 0,8 g

Disolver en 70 ml de agua bidestilada, filtrar y llevar a 100ml. Conservar en frasco color caramelo, a 4 °C.

- *Buffer de corrida 5X*

Glicina 72,0 g

Tris base (Trizma) 15,0 g

SDS 5,0 g

Llevar a 1 L con agua bidestilada. Ajustar a pH 8,3 con HCl

- *Buffer Separador 4X*

Tris base (Trizma) 27,2 g

SDS 0,6 g

TEMED 0,6 ml

Llevar a 150 ml con agua bidestilada. Ajustar a pH 8,8 con HCl

- *Buffer apilador 4X*

Tris base (Trizma) 3,0 g

SDS 0,2 g

TEMED 0,2 ml

Llevar a 50 ml con agua bidestilada. Ajustar a pH 6,8 con HCl

- *Buffer Muestra*

SDS 0,16 g

Glicerol 4,0 ml

Azul de Bromofenol 1 pizca

β- mercaptoetanol 5 %

### 2.2. Preparación de geles de poliacrilamida

*Gel separador acrilamida-bisacrilamida 12,8% (1 mm de espesor)*

Buffer separador 4X 2,50 ml

Agua bidestilada 3,25 ml

Acrilamida-bisacrilamida 30.8% 4,25 ml

Persulfato de amonio 10 % 0,07 ml

*Gel stacking (1 mm de espesor)*

Buffer stacking 4X 0,875 ml

Agua bidestilada 0,980 ml

Acrilamida-bisacrilamida 30.8% 0,455 ml

Persulfato de amonio 10 % 0,045 ml

### 2.3. Armado de los geles, siembra de las muestras, condiciones de corrida y coloración

Los productos fermentados neutralizados se mezclaron con un volumen de buffer muestra y se calentaron durante 2 min en baño a 100 °C. Para el análisis SDS-PAGE se utilizó el método de Laemmli (1970) en geles de 9x8x0,1 cm, disociantes, continuos, con una concentración de acrilamida de 12,8 % p/v (u otra concentración especificada oportunamente) en el gel separador y 4 % en el gel apilador, en un sistema vertical Bio-Rad Mini Protean II (Bio Rad Lab, C.A.).

Para el armado de los geles, se desengrasaron los vidrios de las placas de electroforesis con alcohol y se colocaron entre ellas separadores de 1 mm de espesor. Se fijó en el soporte de placas y se verificó que no existan filtraciones agregando agua destilada. Corroborado esto se vaciaron y se secaron cuidadosamente con papel de filtro sin sacarlas del soporte. Se colocó la solución de gel separador y apilador y por último el peine para formar las calles. Se trasladaron las placas a la cuba electroforética, se incorporó el buffer de corrida 1X frío y se sembraron las muestras. Para determinar el peso molecular de las especies proteicas en las diferentes muestras se sembró una calle de cada gel con una mezcla de proteínas de peso molecular conocido. Se emplearon patrones Amersham GE Healthcare, UK de bajo peso molecular, conteniendo: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), y lactalbúmina (14,4 kDa). Los geles se corrieron seleccionando un voltaje constante de 80 V durante 30 min y luego 120 V durante 90 min, finalmente se tiñeron con Coomasie-R en solución fijadora (Metanol:Ácido acético:Agua destilada, en proporciones 40:20:40). Cuando se requirió detectar cantidades pequeñas de proteínas los geles fueron teñidos con  $\text{Ag}^+$ , para lo cual una vez teñidos con Coomasie se trataron durante 5 min con 60 ml de solución de acetona 50% en agua destilada y luego durante 1 min en 100 ml de solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 % disueltos en 60 ml de agua bidestilada. Se enjuagaron tres veces durante 5 segundos con agua bidestilada y se impregnaron durante 8 min con 0,8 ml de solución de  $\text{AgNO}_3$  20 % y 0,6 ml de formaldehído 37 % en 60 ml de agua bidestilada. Se enjuagaron dos veces durante 5 seg con agua bidestilada y se revelaron durante 20-30 segundos con 1,2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  puro, 25 ml de formaldehído 37 % y 25 ml de solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  10 % en 60 ml de agua bidestilada. La reacción se detuvo por tratamiento durante 30 seg con 60 ml de solución ácido acético glacial 1% en agua bidestilada y enjuague en agua bidestilada durante 10 seg.

## 2.4. Electroforesis Tricina SDS-PAGE

Geles 10%: rango de masas moleculares entre 1 y 100 kDa

Geles 16%: rango de masas moleculares entre 1 y 70 kDa

- *Solución AB3*

Acrilamida 48 g

Bisacrilamida 1,5 g

H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 100 ml

- *Solución AB6*

Acrilamida 46,5 g

Bisacrilamida 3 g

H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 100 ml

Conservar entre 7 y 10 °C.

- *Buffer anódico 10X*

Tris 1 M

HCl 0,225 M

pH 8,9

- *Buffer catódico 10x*

Tris 1 M

Tricina 1 M

HCl 0,225 M

SDS 1 % p/v

pH aprox. 8,25. No debe ser ajustado.

- *Buffer de gel 3x*

Tris 3 M

HCl 1 M

SDS 0,3 % p/v

pH= 8,45

Mantener las soluciones a temperatura ambiente, entre 20–25 °C.

Tabla de preparación de geles para el sistema Mini Protean:

	<b>4%</b> <i>stacking</i>	<b>10%</b> <i>spacer</i>	<b>16%</b> <b>separador</b>	<b>16% +</b> <b>urea 6 M</b>
<b>AB3 o AB6* (ml)</b>	0,33 (AB3)	0,6 (AB3)	3 (AB6)	3 (AB6)
<b>Buffer gel 3X (ml)</b>	1	1	3	3
<b>Glicerol (g)</b>	-	0.3	0.9	-
<b>Urea (g)</b>	-	-	-	3,24
<b>Agua para vol. Final (ml)</b>	4 (2,67 ml)	3 (1,1 ml)	9 (2,1 ml)	9 (0,8 ml)
<b>Persulfato 10% (μl)</b>	30	15	30	30
<b>TEMED (μl)</b>	3	1.5	3	3

\* se usa AB6 si se desea resolver las proteínas de PM <5kDa

Para preparar los geles se cargaron 4,35 ml del gel separador y sin esperar que gelifique se colocaron 500 µl del *spacer*. Se dejó gelificar cubierto con agua destilada. Posteriormente se colocó el *stacking* y el peine formador de calles hasta completar todo el volumen del espacio.

- *Buffer muestra (condiciones reductoras)*

SDS	12% p/v
β-mercaptoetanol	6% v/v
Glicerol	30% p/v
Coomassie blue G-250 (Serva)	0,05%
Tris/HCl	150 mM
pH 7	

- *Buffer muestra (condiciones no reductoras)*

SDS	12% p/v
Glicerol	30% p/v
Coomassie blue G-250 (Serva)	0,05 %
Tris/HCl	150 mM
pH 7	

Se mezclaron las muestras con 1 volumen de buffer muestra, según se desee condiciones reductoras o no. Se calentaron las muestras a 37 °C durante 15 min, se sembraron alrededor de 20-25 mg de proteína por calle.

#### 2.4.1. Condiciones de corrida

Las corridas electroforéticas se realizaron iniciando en 30 V hasta que las proteínas entran al gel *stacking*, la corriente debe estar entre los 25 y 30 mA, y tarda aproximadamente 30 min. Luego se colocó el voltaje en 100 V, se corrió hasta aproximadamente unos 2 cm del final del gel y finalmente se puede subir el voltaje a 150 V.

#### 2.4.2. Visualización de las proteínas

- *Solución Fijadora*

Metanol	50% v/v
Ácido acético	10% v/v

- *Solución colorante*

Coomassie blue	0,025%
Ácido acético	10% v/v.

- *Solución decolorante*

Ácido acético	10% v/v
---------------	---------

Se colocaron los geles en solución fijadora una vez finalizada la corrida. Los geles de 1 mm de espesor y 16% de acrilamida, se dejaron en solución fijadora durante 45 min. Luego se colocaron en solución colorante al menos el doble de tiempo que en la solución fijadora.

Finalmente se colocaron en solución decolorante, varias veces por 15 a 60 min. Luego se transfirieron a agua destilada. En algunos casos se utilizó la tinción con plata descripta anteriormente.

### 3. Medios de cultivo de microorganismos

#### Caldo MRS (Difco, Detroit, USA)

Peptona	10 g/L
Extracto de carne	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
D(+) glucosa	20 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/L
Tween	80,1 g/L
Citrato ácido de amonio	2 g/L
Acetato de sodio	5 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,1 g/L
MnSO <sub>4</sub>	0,05 g/L
pH 6,5 ± 0,2	

#### Agar MRS

Caldo MRS adicionado con agar-agar en concentración 15 g/L.

#### Caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Beauvais, France)

Extracto de carne	3 g/L
Peptona de carne	5 g/L
pH 7 ± 0,2	

#### Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) (Merck, D-64271 Darmstadt, Germany)

Extracto de levadura	5,0 g/L
Glucosa	20,0 g/L
Cloranfenicol	0,1 g/L
Agar	14,9 g/L
pH 6,5	

#### Caldo Luria-Bertani (LB)

Tryptona	10 g/ L
Extracto de levadura	5 g/ L
NaCl	10 g/ L
pH 7,0	

### Agar LB

Caldo LB adicionado con agar-agar en concentración 15 g/L.

### Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (OXOID Ltd, England)

Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8,0 g/L
Digerido péptico de tejido animal	5,0 g/L
Digerido pancreático de caseína	16,0 g/L
Cloruro sódico	5,0 g/L
Glucosa	2,0 g/L
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5 g/L
pH 7,4 ±0,2	

### Agar BHI

Caldo BHI adicionado de agar-agar en concentración 15 g/L.

### Agar Eosin Methylene Blue (EMB)

Peptona	10,0 g/L
Lactosa	5,0 g/L
Sacarosa	5,0 g/L
Fosfato dipotásico	2,0 g/L
Agar	1,35 g/L
Eosina	0,4 g/L
Azul de metileno	0,065 g/L
pH 7,2 ±0,2	

### Agar Mossel

Peptona de carne	10,0 g/L
Extracto de carne	1,0 g/L
Manitol	10,0 g/L
NaCl	10,0 g/L
Rojo fenol	0,025 g/L
Agar	1,5 g/L
pH 7,2 ±0,2	

Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y asépticamente agregar 50 ml/L de emulsión yema de huevo.

### Buffer PBS

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,79 g
NaCl	9 g
Agua bidestilada c.s.p	1 l.
pH 7,4	

#### 4. Detección de IL-6 en suero mediante método de ELISA

Se siguió el protocolo del kit Mouse IL-6 ELISA Set (BD OptEIA™) BD Bioscience.

##### 4.1. Soluciones y buffers

- *Buffer de revestimiento*: Carbonato de sodio 0,1 M, pH=9,5. Almacenar a 2-8 °C.
- *Diluyente*: PBS con 10 % v/v de suero fetal bovino (Gibco). pH=7,0. Preparar en el momento.
- *Solución de lavado*: PBS adicionado de Tween 20, 0,05 %v/v. Preparar en el momento.
- *Buffer citrato*: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 7.10 g + Ácido cítrico anhidro 5,19 g (c.s.p 1 L). Ajustar pH= 5,0. Almacenar a -20 °C.
- *Solución con sustrato*: Ortofenilendiamina (OPD) 1mg/ml y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 µl/ml, en buffer citrato. Preparar en el momento.
- *Solución de detención*: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N.

##### 4.2. Protocolo

Se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc, Thermo Scientific)

- 1- Sensibilización: Cubrir la placa con 50 µl del anticuerpo de captura (dilución 1/250 en buffer de revestimiento). Incubar *overnight*, 4 °C.
- 2- Bloqueo: Retirar el anticuerpo de captura y llenar las fosas con 100 µl de diluyente. Incubar 1 h a 37 °C.
- 3- Lavar las fosas 3 veces, con solución de lavado, utilizando un agitador orbital durante 1 min cada vez. Secar muy bien.
- 4- Muestras: colocar 50 µl fosa de muestra/standard suspendida en el diluyente. Incubar 2h a 37 °C.
- 5- Lavar las fosas 5 veces, con solución de lavado, utilizando un agitador orbital durante 1 min cada vez. Secar muy bien.
- 6- Detección: Agregar 50 µl por fosa de solución de anticuerpo de captura y enzima SAV-HRP (dilución 1/250 de cada uno en diluyente). Incubar 1 h a 37 °C.
- 7- Lavar las fosas 7 veces, con solución de lavado, utilizando un agitador orbital durante 1 min cada vez. Secar muy bien.
- 8- Revelado: Agregar 50 µl por fosa de solución con sustrato. Incubar durante 15-30 min a temperatura ambiente.
- 9- Detención: agregar la solución de detención, 25 µl por fosa.
- 10- Lectura: Medir A<sub>450 nm</sub> dentro de los 30 min posteriores. Sustraer A<sub>570 nm</sub>.



## 5. Preparación y tinción de cortes histológicos con Hematoxilina y Eosina

La preparación y tinción de los cortes histológicos fue realizada en el Servicio de histopatología de la Fundación Favaloro (Buenos Aires, Argentina).

En los modelos de colitis inducida por TNBS, los segmentos de recto de los animales se fijaron en paraformaldehído al 10%, se deshidrataron en un tren de deshidratación que incluyó 3 incubaciones de 10 min en etanol (50%, 70% y 100%) y dos incubaciones en Xilol al 100%. El tejido se incluyó luego en parafina fundida a 60 °C. Se tomaron secciones de 7-10 µm de espesor utilizando un micrótopo, se fijaron las secciones en portaobjetos con calor y se eliminaron los restos de parafina lavando con xilol. Se rehidrataron los preparados utilizando el tren de deshidratación en sentido inverso. Los preparados, lavados con agua destilada para eliminar los restos de etanol, se sumergieron durante 10 min en una preparación de hematoxilina, se lavaron con etanol y luego con agua destilada hasta eliminar los restos del colorante. Luego se sumergieron los preparados en eosina durante 30 seg y se enjuagaron con agua destilada. Se deshidrataron nuevamente los preparados y se dejaron 10 min en xilol, Finalmente, se secaron y se montaron los cubreobjetos con resina de montaje.

## 6. Evaluación del metabolismo celular en macrófagos

Estos ensayos fueron realizados en el Instituto Pasteur de Lille (Francia) en colaboración con el grupo dirigido por Dr. Jean-Claude Sirard y el grupo del IIFP (UNLP-CONICET) dirigido por el Dr. Martin Rumbo.

Para la generación macrófagos se emplearon ratones C57BL/6J (hembras de 6-8 semanas de edad) obtenidas de los laboratorios de Janvier (St. Berthevin, Francia) y ratones deficientes del receptor GPR81 (Ahmed y col., 2010). Todos los experimentos cumplieron con las regulaciones nacionales e institucionales actuales y directrices éticas (B59-350009 - Institut Pasteur de Lille). Se utilizó la médula ósea de fémur y tibia de ratones como fuente de precursores de células hematopoyéticas. Se obtuvieron los macrófagos derivados de médula ósea con 8 días de diferenciación de los precursores ( $10^6$  células/ml) en DMEM completo adicionado de 30 % de medio condicionado de células L929 (fuente de M-CSF). Las células se suplementaron con medio fresco cada 3 días.

Se determinó el flujo glucolítico en macrófagos mediante la medida de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) empleando el equipo *Seahorse XF24 Extracelular Flux Analyzer* (Seahorse, Biosciences). Los macrófagos se sembraron en placas de cultivo de 24 fosas a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células por fosa. Antes del análisis de ECAR, el medio de cultivo se retiró y se incubaron las células en DMEM (Sigma) suplementado con glutamina 2

mM (Invitrogen). Se determinó el parámetro ECAR en función del tiempo. Se evaluó la alteración de ECAR frente al agregado de agua (control), LPS (InvivoGen, Toulouse, Francia) y lactato 68 mM. En todos los experimentos, se utilizó tratamiento secuencial con oligomicina 2  $\mu$ M (Sigma) y luego 2-desoxiglucosa 100 mM (Sigma) para inhibir la cadena respiratoria mitocondrial y bloquear la glucólisis, respectivamente. Las medidas se normalizaron según el contenido de ADN empleando el ensayo CyQuant (Invitrogen). Los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar.

# Referencias bibliográficas

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, A. G., Garrote, G. L., & De Antoni, G. L. (2005) Productos fermentados artesanales como fuente de microorganismos probióticos. *Industria Lechera*, 739, 3-4.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Langhans, C. D., Hanson, J., Michalski, C. W., Kölker, S., Jones, P. M., Okun, J. G., Offermanns, S. (2009a) Deorphanisation of GPR109B as a receptor for the beta-Oxidation intermediate 3-OH-octanoic acid and its role in the regulation of lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21928–21933.
- Ahmed, K., Tunaru, S., & Offermanns, S. (2009b) GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxycarboxylic acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 557-62.
- Ahmed, K., Tunaru, S., Tang, C., Muller, M., Gille, A., Sassmann, A., Hanson, J., & Offermanns, S. (2010) An autocrine lactate loop mediates insulin-dependent inhibition of lipolysis through GPR81. *Cell Metabolism*, 11, 311-9.
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000) Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2001-2005.
- Alex, P., Zachos, N. C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T. E., Conklin, L. S., Centola, M., & Li, X. (2009) Distinct Cytokine Patterns Identified from Multiplex Profiles of Murine DSS and TNBS-Induced Colitis. *Inflammatory Bowel Disease*, 15(3), 341–352.
- Alm, L. (1982) Effect of fermentation on milk fat of Swedish fermented milk products. *Journal of Dairy Science*, 65, 521-532.
- Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., & Heperkan, D. (2013) A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 44-56.
- Altier, C. (2005) Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *Journal of Microbiology*, 43, 85-92.
- Anderle, P., Rumbo, M., Sierro, F., Mansourian, R., Michetti, P., Roberts, M. A., & Kraehenbuhl, J. P. (2005) Novel Markers of the Human Follicle—Associated Epithelium Identified by Genomic Profiling and Microdissection. *Gastroenterology*, 129(1), 321-327.
- Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Park, Z., McCann, M. J., Kelly, W. J., & Roy, N. C. (2010) *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by

- increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology*, 10(1), 316.
- Angulo, L., Lopez, E., & Lema, C. (1993) Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain). *Journal of Dairy Research*, 60(2), 263-267.
- Angulo, L., Medina Canalejo, L. M., & Jodral Villarejo, M. L. (1995) Importancia de los probióticos en la alimentación. *Nutrición Clínica*, 4(15), 179-187.
- Argañaraz-Martínez, E., Babot, J. D., Apella, M. C., & Perez Chaia, A. (2013) Physiological and functional characteristics of *Propionibacterium* strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic products. *Anaerobe*, 23, 27-37.
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013) Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504(7480), 451-455.
- Assadi, M. M., Pourahmad, R. & Moazami, N. (2000) Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 541-543.
- Autschbach, F., Giese, T., Gassler, N., Sido, B., Heuschen, G., Heuschen, U., Zuna, I., Schulz, P., Weckauf, H., Berger, I., Otto, H. F., & Meuer, S. C. (2002) Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Archives*, 441, 500-513.
- Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Third Edition, Revised and Expanded, edited by Salminen, S., von Wrigth, A., & Ouwehand, A. (Marcel Dekker, Inc). ISBN: 0-8247-5332-1.
- Barbosa, A. F., Santos, P. G., Lucho, A. M. S., & Schneedorf, J. M. (2011) Kefiran can disrupt the cell membrane through induced pore formation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1-2), 61-66.
- Bellavia, M., Rappa, F., Lo Bello, M., Brecchia, G., Tomasello, G., Leone, A., Spatola, G., Uzzo, M. L., Bonaventura, G., David, S., Damiani, P., Hajj Hussein, I., Zeenny, M. N., Jurjus, A., Schembri-Wismayer, P., Cocchi, M., Zummo, G., Farina, F., Gerbino, A., Cappello, F., & Traina, G. (2014) *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* supplementation reduces tissue damage of intestinal mucosa and liver after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid treatment in mice. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 28(2), 251-61.
- Bergman, E. N. (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70(2), 567-590.
- Berry, D., & Reinisch, W. (2013) Intestinal microbiota: a source of novel biomarkers in inflammatory bowel diseases?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 47-58.

- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Simov, Z. I., Frengova, G. I., & Spasov, Z. N. (2002) Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, 19, 537-544.
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., & Dimitrov, Z. H. P. (2003) Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, 13(7), 529-535.
- Blad, C. C., Tang, C., & Offermanns, S. (2012) G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 603-619.
- Bolla, P. A., Abraham, A. G., Pérez, P. F., & de los Angeles Serradell, M. (2016). Kefir-isolated bacteria and yeasts inhibit *Shigella flexneri* invasion and modulate pro-inflammatory response on intestinal epithelial cells. *Beneficial microbes*, 7 (1), 103-110.
- Bonen, A., Heynen, M., & Hatta, H. (2006) Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 31, 31-39.
- Bottazzi, V., & Bianchi, F. (1980) A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Bacteriology*, 48(2), 265-268.
- Bottazzi, V., Zacconi, C., Sarra, P. G., Dallavalle, P., & Parisi, M. G. (1994) Kefir: Microbiologia, Chimica e Tecnologia. *Industria del Latte*, 30(1), 41-62.
- Brenna, Ø., Furnes, M. W., Drozdov, I., van Beelen Granlund, A., Flatberg, A, Zwigelaar, R. T. M., Mårvik, R., Nordrum, I. S., Kidd, M., & Björn I. G. (2013) Relevance of TNBS-Colitis in Rats: A Methodological Study with Endoscopic, Histo and Transcriptomic Characterization and Correlation to IBD. *PLoS ONE*, 8(1), 54543.
- Brialy, C., Rivalland, P., Coiffard, L., & De Roeck Holtzhauer, Y. (1995) Microbiological study of lyophilized dairy kefir. *Folia Microbiologica*, 40(2), 198-200.
- Brown, A. J., Goldsworthy, S. M., Barnes, A. A., Eilert, M. M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A. I., Wigglesworth, M. J., Kinghorn, I., Fraser, N. J., Pike, N. B., Strum, J. C., Steplewski, K. M., Murdock, P. R., Holder, J. C., Marshall, F. H., Szekeres, P. G., Wilson, S., Ignar, D. M., Foord, S. M., Wise, A., & Dowell, S. J. (2003) The orphan G-protein coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11312-11319.
- Burger-van Paassen, N., Vincent, A., Puiman, P. J., Van Der Sluis, M., Bouma, J., Boehm, G., ... & Renes, I. B. (2009) The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. *Biochemical Journal*, 420(2), 211-219.
- Burkholder, K. M., & Bhunia, A. K. (2009) *Salmonella* enterica serovar Typhimurium adhesion and cytotoxicity during epithelial cell stress is reduced by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Gut Pathogens*, 1(1), 1.

- Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee, K. (2007) The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G315-G322.
- Cai, T., Ren, N., Jin, L., Cheng, K., Kash, S., Chen, R., Wright, S. D., Taggart, A. K. P., & Waters, M. G. (2008) Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377, 987-991.
- Carasi, P., Racedo, S. M., Jacquot, C., Romanin, D. E., Serradell, M. A., & Urdaci, M. C. (2015) Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. *Journal of Immunology Research*, Article ID 361604. DOI: 10.1155/2015/361604
- Carpenter, C. E., & Broadbent, J. R. (2009) External concentration of acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acid foods. *Journal of Food Science*, 74(1), 12-15.
- Cevikbas, A., Yemni, E., Ezzedenn, F. W., Yardimici, T., Cevikbas, U., & Stohs, S. J. (1994) Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. *Phytotherapy Research*, 8(2), 78-82.
- Cha, Y. S., Seo, J-G., Chung, M-J., Cho, C. W., & Youn, H. J. (2014) A mixed formulation of lactic acid bacteria inhibits Trinitrobenzene- Sulfonic-Acid-Induced inflammatory changes of the colon tissue in mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 1438-1444.
- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.
- Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A., & Rousset, M. (1994) Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: Evidence for glucose-dependent negative regulation. *Journal of Cell Science*, 107(1), 213-225.
- Cheirsilp, B., Shimizu, H., & Shioya, S. (2003) Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 100, 43-53.
- Chen, H., Wang, S., & Chen, M. (2008) Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25(3), 492-501.
- Chen, Y. P., Hsiao, P. J., Hong, W. S., Dai, T. Y., & Chen, M. J. (2012) *Lactobacillus kefirifaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Science*, 95, 63-74.
- Chen, Y-P., & Chen, M-J. (2013) Effects of *Lactobacillus kefirifaciens* M1 Isolated from Kefir Grains on Germ-Free Mice. *PLoS ONE*, 8(11), e78789.

- Cheng, H. (2010) Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 938-950.
- Cherbut, C., Aube, A. C., Blottiere, H. M., & Galmiche, J. P. (1997) Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scandinavian Journal of Gastroenterology Suppl*, 222, 58-61
- Cherbut, C., Michel, C., & Lecannu, G. (2003) The prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of TNBS-induced colitis in rats. *Journal of Nutrition*, 133, 21-27.
- Chiang, B. L., Sheih, Y. H., Wang, L. H., Liao, C. K., & Gill, H. S. (2000) Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimisation and definition of cellular immune responses. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 849-855.
- Claing, A., Laporte, S. A., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Progress in Neurobiology*, 66(2), 61-79.
- Clancy, R. (2003) Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38 (1), 9-12.
- Clare, D. A & Swaisgood, H. E. (2000) Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 1187-1195.
- Coconnier, M. H., Lievin, V., Bernet-Camard, M. F., Hudault, S., & Servin, A. L. (1997) Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1046-1052.
- Coconnier, M. H., Lievin, V., Lorrot, M., & Servin, A. L. (2000) Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1152-1157.
- Collado, M. C., Isolauri, E., & Salminen, S. (2008) Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 285(1), 58-64.
- Commane, D. M., Shortt, C. T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R. M., & Rowland, I. R. (2005) Effects of Fermentation Products of Pro- and Prebiotics on Trans-Epithelial Electrical Resistance in an In Vitro Model of the Colon. *Nutrition and Cancer*, 51(1), 102-109.
- Consejo Canadiense de Protección de los Animales. (1998). Control del dolor animal en la investigación, la enseñanza y pruebas. In L. Estol & R. Dugas (Eds.), Manual sobre cuidado y uso de animales de experimentación (2nd ed., Vol. 1, pp. 193-213). Ottawa, Ontario, Canada: Consejo Canadiense de Protección de los Animales.



- Cook, S. I., & Sellin J. H. (1998) Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 12, 499–507.
- Corte Osorio, L. Y., Martínez-Flores, H. E., & Ortiz-Alvarado, R. (2011) Efecto del consumo de fibra dietética en la expresión cuantitativa del receptor de butirato GPR43 en colon de ratas. *Nutrición Hospitalaria*, 26(5), 1052-1058.
- Cox, M. A., Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Laverty, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., Monsma, F., Vassileva, G., Maguire, M., Gustafson, E., Bayne, M., Chou, C. C., Lundell, D., & Jenh, C. H. (2009) Short-chain fatty acids act as anti-inflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World Journal of Gastroenterology*, 15(44), 5549–5557.
- Cuff, M. A., Lambert, D. W., & Shirazi-Beechey, S. P. (2002) Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *The Journal of Physiology*, 539(2), 361-371.
- Cummings, J. H. (1998) Dietary carbohydrates and the colonic microflora. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 1(5), 9–14.
- Cummings, J. H., & MacFarlane, G. T. (1997) Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition*, 16(1), 3-11.
- D'Arienzo, R., Maurano, F., Lavermicocca, P., Ricca, E., & Rossi, M. (2009) Modulation of the immune response by probiotic strains in a mouse model of gluten sensitivity. *Cytokine*, 48, 254–9.
- da Cruz Pedrozo Miguel, M. G., Gomes Cardoso, P., de Assis Lago, L., & Freitas Schwan, R. (2010) Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, 43, 1523–1528.
- Dallas, D. C., Citerne, F., Tian, T., Silva, V. L. M., Kalanetra, K. M., Frese, S. A., Robinson, R. C., Mills, D. A., & Barile, D. (2016) Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistry*, 197, 273–284.
- De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Nagy, I. (2006) Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 259, 89-96.
- De Moreno De LeBlanc, A., Matar, C., Farnworth, E., & Perdígón, G. (2007) Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1920-1928.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., Backhed, F., & Mithieux, G. (2014) Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156, 84–96.

- De Vrese, M., Keller, B., & Barth, C. A. (1992) Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*, 67(1), 67-65.
- Defea, K. (2008) Beta-arrestins and heterotrimeric G-proteins: collaborators and competitors in signal transduction. *British Journal of Pharmacology*, 153(1), S298-309.
- Del Punta, K., Charreau, E. H., & Pignataro, O. P. (1996) Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*, 137, 5337.
- Delfederico, L., Hollmann, A., Martinez, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G. L., & Semorile, L. (2006) Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 73, 20-27.
- Devaraj, S., Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013) La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: Implicaciones con la obesidad y la diabetes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(2), 421-34.
- Dimmer, K. S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J. W., & Broer, S. (2000) The low affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochemical Journal*, 350, 219-227.
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., Garrote, G. L. (2014) Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 43-53.
- Dobson, A., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, P., & Hill, C. (2011) High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiology Letters*, 320(1), 56-62.
- Donnelly, R. P., & Finlay, D. K. (2015) Glucose, glycolysis and lymphocyte responses. *Molecular immunology*, 68(2), 513-519.
- Dousset, X., & Caillet, F. (1993) Aspects microbiologiques et biochimiques de la fermentation du kefir. *Microbiologie Aliments Nutrition*, 11, 463-470.
- Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2004) Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5810.
- Dwivedi, M., Kumar, P., Laddha, N. C., & Kemp, E. H. (2016) Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.01.002.
- Ebner, J., Arslan, A. A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015) Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from

- caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117, 41-57.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., & Adami, H. O. (1990) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *New England Journal of Medicine*, 323, 1228-33.
- Elfahri, K. R., Donkor, O. N., & Vasiljevic, T. (2014) Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, 38(1), 37-46.
- Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M. O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., & van Sinderen, D. (2012) Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(6), 2108-13.
- FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Jointworking group report on drafting. London, Ontario, 2002, 1-11.
- Farnworth, E. R. (2005) Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin - Functional Foods*, 2, 1-17.
- Farnworth, E. R., & Mainville, I. (2008) Kefir – A Fermented Milk Product. In: Farnworth, E. R. (2th ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (2 ed). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 89-127.
- Fernández Villamil, M. J., Miranda Ordieres, A. J., & Tuñón Blanco, P. (1997) Immobilized enzyme electrode for the determination of L-lactate in food samples. *Analytica Chimica Acta*, 345, 37-43.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Monteiro, D., Faria, S., Cruz, S., Perreira, A., Roque A. C., & Tavares, P. (2010) Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 27-31.
- Fitzgerald, R. J., & Murray, B. A. (2006) Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118-125.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(10), 577-589.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002) *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 67-75.

- Frengova, G. I., Simovaa, E. D., Beshkova, D. M., & Simov, Z. I. (2002) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c, 805-810.
- Furrie, E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J. H., Walsh, S. V., O'neil, D.,A., & Macfarlane, G. T. (2005) Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum* /Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut*, 54, 242-249.
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., & Ohno, K. (2013) Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446-450.
- Fusunyan, R. D., Quinn, J. J., Fujimoto, M., MacDermott, R. P., & Sanderson, I. R. (1999) Butyrate switches the pattern of chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. *Molecular Medicine*, 5, 631-640.
- Galán, J. E., & Wolf-Watz, H. (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444(7119), 567-573.
- Gao, H., Sun, Y., Wu, Y., Luan, B., Wang, Y., Qu, B., & Pei, G. (2004) Identification of  $\beta$ -arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF- $\kappa$ B pathways. *Molecular Cell*, 14(3), 303-317.
- Garbers, I., Britz, T. J., & Witthuhn, R. C. (2004) PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(7), 687-693.
- Garcia, C. K., Brown, M. S., Pathak, R. K., & Goldstein, J. L. (1995) cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 1843-1849.
- García Fontán, M. C., Martinez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2006) Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16, 762-767.
- García Quintans, N., Blancato, V., Repizov, G., Magni, C., & López, P. (2008) Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. En: *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications*. Editors: Mayo B.; López P. & Pérez-Martínez G. 65-88. ISBN: 978-81-308-0250-3.
- García Sáinz, J. A. (1996) "Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular" D.R.© 1996 – Fondo de Cultura Económica - ISBN 968-16-5080-8.

- Gareau, M. G., Sherman, P. M., & Walker, W. A. (2010) Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7(9), 503-514.
- Garedew, A., Henderson, S. O., & Moncada, S. (2010) Activated macrophages utilize glycolytic ATP to maintain mitochondrial membrane potential and prevent apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 17, 1540–1550.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., & Clementi, F. (2015) Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology*, 49, 123-133.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1997) Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT - Food Science and Technology*, 30(1), 77-84.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1998) Characteristics of kefir prepared with different grain: Milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 149-154.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2000) Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63(3), 364-369.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639-652.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010) Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. En: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Editors Mozzì, F., Raya, R., & Vignolo, M. 327-340 of 393. ISBN 978-0-8138-1583-1 Blackwell Publishing Ames USA.
- Ge, H., Weizmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., Chen, J. L., Tian, H., & Li, Y. (2008) Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81. *Journal of Lipid Research*, 49, 797-803.
- Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., & Senesi, S. (2002) Identification and characterisation of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters*, 208, 129-134.
- Gibson, G. R., Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., Allison, C., Segal, I., Vorster, H. H., & Walker, A. R. P. (1990) Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut*, 31, 679–683.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J., & Cross, M. L. (2000) Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84(1), S111-S117.

- Gill, R. K., Saksena, S., Alrefai, W. A., Sarwar, Z., Goldstein, J. L., Carroll, R. E., Ramaswamy, K., & Dudeja, P. K. (2005) Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 289, C846–C852.
- Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A.G., & De Antoni, G. L. (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), 264-273.
- Grisham, M. B., Ware, K., Gilleland, H. E. Jr, Gilleland, L. B., Abell, C. L., & Yamada, T. (1992) Neutrophil-mediated nitrosamine formation: role of nitric oxide in rats. *Gastroenterology*, 103(4), 1260-6.
- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011) Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21, 601–606.
- Gusils, C., Oppezzo, O., Pizarro, R., & González, S. (2003) Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(7), 472-478.
- Guzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Bodine, A. B. (2000) Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(1), 35-43.
- Guzel-Seydim, Z., Wyffels, J. T., Seydim, A. C., & Greene, A. K. (2005) Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 25–29.
- Hadjiagapiou, C., Schmidt, L., Dudeja, P. K., Layden, T. J., & Ramaswamy, K. (2000) Mechanism(s) of butyrate transport in Caco-2 cells: role of monocarboxylate transporter 1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279, G775–G780
- Halestrap, A. P., & Meredith, D. (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archives*, 447, 619–628.
- Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., & Brummer, R. J. (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27, 104–19.
- Hamet, M. F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G. L., Huys, G., Vandamme, P., & Abraham, A. G. (2013) Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranoferiens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiology*, 36, 327-334.



- Hayaloglu, A. A., & Karagul-Yuceer, Y. (2011) Utilization and characterization of small ruminants' milk and milk products in turkey: Current status and new perspectives. *Small Ruminant Research*, 101(1-3), 73-83.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132, 344-362.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2007) Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnology Journal*, 2, 426-434.
- Hebert, E. M., Mamone, G., Picariello, G., Raya, R. R., Savoy, G., Ferranti, P., & Addeo, F. (2008). Characterization of the pattern of  $\alpha$ s1- and  $\beta$ -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3682-3689.
- Hebert, M. E., Saavedra, L., & Ferranti, P. (2010) Bioactive Peptides Derived from Casein and Whey Proteins, in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (eds F. Mozzi, R. R. Raya and G. M. Vignolo), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780813820866.ch13
- Helander, I. M., Von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 8(5), 146-150.
- Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013) Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(1), 39-51.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004) Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1504-1510.
- Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003) Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582-587.
- Hijova E, & Chmelarova A. (2007) Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislava Medical Journal*, 108, 354-358.
- Hinnebusch, B. F., Meng, S., Wu, J. T., Archer, S. Y., & Hodin, R. A. (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *Journal of Nutrition*, 132(5), 1012-7.
- Hlastan-Ribič, C., Cerar, A., Pokorn, D., Perše, M., & Zebič, A. (2005) Effect of kefir containing various levels of fat on chemically induced colorectal epithelium tumors in wistar rats. *Nutrition Research*, 25(1), 55-63.

- Hong, W. S., Chen, H. C., Chen, Y. P., & Chen, M. J. (2009) Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on cytokine production by macrophage. *International Dairy Journal*, 19(4), 244-251.
- Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F., & Mehal, W. Z. (2014) Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*, 146(7), 763-774.
- Hou, J. K., Abraham, B., & El-Serag, H. (2011) Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American Journal of Gastroenterology*, 106, 563-73.
- Hudault, S., Lievin, V., Bernet-Camard, M.-F., & Servin, A. L. (1997) Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 513-518.
- Hughes, E. A., & Galan, J. E. (2002) Immune response to Salmonella: location, location, location?. *Immunity*, 16, 325-328.
- Hugo, A. A., Kakisu, E., De Antoni, G. L., & Pérez, P. F. (2008) Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 613-619.
- Hull, M. E. (1947) Studies on milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *Journal of Dairy Science*, 30, 881-884.
- Hummel, S., Veltman, K., Cichon, C., Sonnenborn, U., & Schmidt, M. A. (2012) Differential targeting of the E-cadherin/-catenin complex by Gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1140-1147.
- Iraporda, C., Errea, A., Romanin, D. E., Cayet, D., Pereyra, E., Pignataro, O., Sirardc, J. C., Garrotea, G. L., Abraham, A. G., & Rumbo, M. (2015) Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, 220(10), 1161-1169.
- Irigoyen, A., Ortigosa, M., Torre, P., & Ibanez, F. C. (2003) Influence of different technological parameters in the evolution of pH during fermentation of kefir. *Milchwissenschaft*, 58, 631-633.
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., & Ibáñez, F. C. (2005) Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90, 613-620.
- Irigoyen, A., Ortigosa, M., Garcia, S., Ibáñez, F. C., & Torre, P. (2012) Comparison of free amino acids and volatile components in three fermented milks. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 578-584.



- Irukayama-Tomobe, Y., Tanaka, H., Yokomizo, T., Hashidate-Yoshida, T., Yanagisawa, M., & Sakurai, T. (2009) Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein coupled receptor, GPR109B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 106(10), 3930–3934.
- Ismail, A. A., Ghaly, M., F., & El-Naggar, A., K. (2011) Milk kefir: Ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Current Microbiology*, 62(5), 1602-1609.
- Jianzhong, Z., Xiaoli, L. B., Hanhu, J., & Mingsheng, D. (2009) Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26, 770–775.
- Juel, C., & Halestrap, A. P. (1999) Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *Journal of Physiology*, 517(3), 633–642.
- Jurjus, A. R., Khoury, N. N., & Reimund, J. M. (2004) Animal models of inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 50, 81–92.
- Kabadjova-Hristova, P., Bakalova, S., Gocheva, B. & Moncheva, P. (2006) Evidence of proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(2), 89-94.
- Kakisu, E. J., Abraham, A. G., Perez, P. F., & De Antoni, G. L. (2007) Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2613-2616.
- Kakisu, E. J. (2010) Tesis doctoral: Desarrollo y optimización del proceso para la elaboración de leches fermentadas con microorganismos aislados de gránulos de kefir con características tecnológicas y probióticas definidas. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Kang, I., Kim, S. W., & Youn, J. H. (2011) Effects of nicotinic acid on gene expression: potential mechanisms and implications for wanted and unwanted effects of the lipid-lowering drug. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10), 3048-3055.
- Kang, D. S., Tian, X., & Benovic, J. L. (2014) Role of  $\beta$ -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 27, 63-71.
- Kawada, M., Arihiro, A., & Mizoguchi, E. (2007) Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(42), 5581-559.
- Kekuda, R., Manoharan, P., Baseler, W., & Sundaram, U. (2013) Monocarboxylate 4 mediated butyrate transport in a rat intestinal epithelial cell line. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(3), 660-667.

- Kelly, B., & O'Neill, L. A. J. (2015) Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Research*, 25, 771-784.
- Kendrick, S. F., O'Boyle, G., Mann, J., Zeybel, M., Palmer, J., Jones, D. E., & Day, C. P. (2010) Acetate, the key modulator of inflammatory responses in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 51(6), 1988-1997.
- Kennedy, R. L., Vangaveti, V., Jarrod, G., Shashidhar, V., & Baune, B. T. (2010) Review: Free fatty acid receptors: emerging targets for treatment of diabetes and its complications. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 1(4), 165-175.
- Kesenkaş, H., Dinkç, N., Seçkin, K., Kinik, O., Siddik, G., Ergonul, P. G., & Kavas, G. (2011) Physicochemical, microbiological and sensory characteristic of soymilk kefir. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3737-3746.
- Kiefer, J., Beyer-Sehlmeyer, G., & Pool-Zobel, B. L. (2006) Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells. *British Journal of Nutrition*, 96, 803-810.
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., ... & Tsujimoto, G. (2011). Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 8030-8035.
- Kirat, D., Inoue, H., Iwano, H., Hirayama, K., Yokota, H., Taniyama, H., & Kato, S. (2006) Monocarboxylate transporter 1 gene expression in the ovine gastrointestinal tract. *Veterinary Journal*, 171(3), 462-467.
- Kirjavainen, P. V., Arvola, T., Salminen, S. J., & Isolauri, E. (2002) Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning?. *Gut*, 51, 51-5.
- Kleessen, B., Kroesen, A. J., Buhr, H. J., & Blaut, M. (2002) Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37, 1034-1041.
- Knowles, H. J., te Poele, R. H., Workman P., & Harris, A. L. (2006) Niacin induces PPARgamma expression and transcriptional activation in macrophages via HM74 and HM74-mediated induction of prostaglandin synthesis pathways. *Biochemical Pharmacology*, 71(5): 646-56.
- Kok-Tas, T., Ekinci, F. Y., & Guzel-Seydim, Z. B. (2012) Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 126-131.

- Komiyama, Y., Andoh, A., Fujiwara, D., Ohmae, H., Araki, Y., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., & Kanauchi, O. (2011) New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46(1), 40-52.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- Koroleva, N. S. (1988) Starters for fermented milks, section 4: kefir and kumys starters. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 227, 3540.
- Koroleva, N. S. (1991) Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K., editor. Therapeutic properties of fermented milks: 159-179. *Elsevier Applied Sciences Publishers*, London, UK.
- Korsak, N., Taminiau, B., Leclercq, M., Nezer, C., Crevecoeur, S., Ferauche, C., Detry, E., Delcenserie, V., & Daube, G. (2015). Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3684-3689.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2, 189-198
- Krawczyk, C. M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R. J., Cross, J. R., Jung, E., Thompson, C. B., Jones, R. G., & Pearce, E. J. (2010) Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*, 115(23), 4742-9.
- La Rivière, J. W. M., Kooiman, P., & Schmidt, K. (1967) Kefiran, a novel polysaccharide produced in the Kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie*, 59, 269-278.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lam, W. K., Felmlee, M. A., & Morris, M. E. (2010) Monocarboxylate Transporter-Mediated Transport of  $\beta$ -Hydroxybutyric Acid in Human Intestinal Caco-2 Cells. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(3), 441-447.
- Lamarque, M., Aubel, D., Piard, J. C., Gilbert, C., Juillard, V., & Atlan, D. (2011) The peptide transport system Opt is involved in both nutrition and environmental sensing during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Microbiology*, 157(6), 1612-1629.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... & Funke, R. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.

- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., & Mogil, J. S. (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7(6), 447–449.
- Larsen, H. D. & Jørgensen, K. (1999) Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 173-176.
- Latham, T., Mackay, L., Sproul, D., Karim, M., Culley, J., Harrison, D. J., Hayward, L., Langridge-Smith, P., Gilbert, N., & Ramsahoye, B. H. (2012) Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Research*, 40(11), 4794–4803.
- Latorre-García, L., Del Castillo-Agudo, L., & Polaina, J. (2007) Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 785-791.
- Le Poul, E., Loison, C., Struyf, S., Springel, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Van Damme, J., Parmentier, M., & Detheux, M. (2003) Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25481-25489.
- LeBlanc, J. G., Matar, C., Valdéz, J. C., LeBlanc, J., & Perdigon, G. (2002) Immunomodulating Effects of Peptidic Fractions Issued from Milk Fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 85, 2733-2742.
- LeBlanc, J., Fliss, I., & Matar, C. (2004) Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(6), 1171-1181.
- Lecona, E., Olmo, N., Turnay, J., Santiago-Gómez, A., López de Silanes, I., Gorospe, M., & Lizarbe, M. A. (2008) Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms. *Biochemical Journal*, 409(1), 311-20.
- Lee, H., Friend, B.A., & Shahani, K.M. (1988) Factors Affecting the Protein Quality of Yogurt and *Acidophilus* Milk. *Journal of Dairy Science*, 71(12), 3203–3213.
- Lee, B. J., & Bak, Y.-T. (2011) Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 17, 252–66.
- Lee, S. U., In H.J., Kwon M.S., Park B.O., Jo M., Kim M.O., Cho S., Lee S., Lee H.J., Kwak Y.S. & Kim S. (2013)  $\beta$ -Arrestin 2 Mediates G Protein-Coupled Receptor 43 Signals to Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(11), 1754-1759.

- Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, T. J., & Paschoalin, F. V. M. (2013a) Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349.
- Leite, A. M. O., Leite, D. C. A., Del Aguila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A. L., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013b) Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, 96, 4149-4159.
- Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R. S., & Golde, D. W. (1998) Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 28959-28965.
- Lin, C., Chen, H., & Liu, J. (1999) Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in taiwan. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54(1), 14-18.
- Liu, J., & Lin, C. (2000) Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, 65(4), 716-721.
- Liu, J., Wang, S., Lin, Y., & Lin, C. (2002) Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, 44(2), 182-187.
- Liu, J., Wang, S., Chen, M., Chen, H., Yueh, P., & Lin, C. (2006) Hypocholesterolemic effects of milk-kefir and soya milk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*, 95(5), 939-946.
- Liu, C., Wu, J., Zhu, J., Kuei, C., Yu, J., Shelton, J., Sutton, S. W., Li, X., Yun, S. Y., Mirzadegan, T., Mazur, C., Kamme, F., & Lovenberg, T. W. (2009) Lactate Inhibits Lipolysis in Fat Cells through Activation of an Orphan G-protein-coupled Receptor, GPR81. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 2811-2822.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Londero, A., Quinta, R., Abraham, A. G., Sereno, R., De Anton, G. L., & Garrote, G. L. (2011) Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, 74(1), 94-100.
- Londero, A., Hamet, M. F., De Antoni, G. L., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2012) Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. *Journal of Dairy Research*, 79, 262-271.
- Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2015) Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: Antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 118-126.

- Lopitz-Ostoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006) Kefir: A symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana Micología*, 23, 67–74.
- Loretan, T., Mostert, J. F., & Viljoen, B. C. (2003) Microbial flora associated with south african household kefir. *South African Journal of Science*, 99(1-2), 92-94.
- Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2007) Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1197-1208.
- Louis, P., & Flint, H. J. (2009) Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), 1-8.
- Lund, T., & Granum, P. E. (1997) Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 143, 3329-3336.
- Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (2002) The role of b-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science*, 115(3), 455-465.
- Lyra, A., Krogius-Kurikka, L., Nikkilä, J., Malinen, E., Kajander, K., Kurikka, K., Korpela, R., & Palva, A. (2010) Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC Gastroenterology*, 10(1), 1.
- Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 67–72.
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A. T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., McKenzie, C. I., Hijikata, A., Wong, C., Binge, L., Thorburn, A. N., Chevalier, N., Ang, C., Marino, E., Robert, R., Offermanns, S., Teixeira, M. M., Moore, R. J., Flavell, R. A., Fagarasan, S., & Mackay, C. R. (2015) Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nature Communications*, 6, 6734.
- Maciejewski-Lenoir, D., Richman, J. G., Hakak, Y., Gaidarov, I., Behan, D. P., & Connolly, D. T. (2006) Langerhans cells release prostaglandin D2 in response to nicotinic acid. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), 2637–264.
- Magalhães, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A., de Almeida Silva, J. B., & Schwan, R. F. (2010) Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, 101(22), 8843-8850.



- Magalhães, K. T., de Melo Pereira, G. V., Campos, C. R., Dragone, G., & Schwan, R. F. (2011a) Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 693–702.
- Magalhães, K. T., Dias, D. R., de Melo Pereira, G. V., Oliveira, J. M., Domingues, L., Teixeira, J. A., de Almeida Silva, J. B., & Schwan, R. F. (2011b) Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(4), 871-878.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servinc, A., & De Vuysta, L. (2006) Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157(3), 241-247.
- Malheiros Silveira, A. L., Matos Ferreira, A. V., Chaves de Oliveira, M., Alvarenga Rachid, M., Fonseca da Cunha Sousa, L., Martins, F., Gomes-Santos, A. C., Vieira, A. T., & Teixeira, M. M. (2015) Preventive rather than therapeutic treatment with high fiber diet attenuates clinical and inflammatory markers of acute and chronic DSS-induced colitis in mice. *European Journal of Nutrition*. DOI 10.1007/s00394-015-1068-x.
- Mané, J., Lorén, V., Pedrosa, E., Ojanguren, I., Xaus, J., Cabré, E., Domenechand, E., & Gassull, M. A. (2009) *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 Prevents and Reverts Intestinal Damage on TNBS-induced Colitis in Mice. *Inflammatory Bowel Disease*, 15(8), 1155-1163.
- Manning Fox, J. E., Meredith, D., & Halestrap, A. P. (2000) Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *Journal of Physiology*, 529(Pt 2), 285–293.
- Mañé Almero, J. (2007) Modelos experimentales *in vivo* de enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal: Conceptos, modelos actuales y aplicabilidad. *Nutrición Hospitalaria*, 22(2), 178-189.
- Mariadason, J. M., Barkla, D.H., Gibson R.P. (1997) Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *American Journal of Physiology*, 272, G705–G712.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P.D. (2013) Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1), 79-85.
- Marteau, P., Seksik, P., Lepage, P., & Doré, J. (2004) Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini-reviews in Medical Chemistry*, 4(8), 889-896.
- Marteau, P. (2006) Probiotics, prebiotics, synbiotics: ecological treatment for inflammatory bowel disease?. *Gut*, 55, 1692-1693.

- Martin, P. M., Ananth, S., Cresci, G., Roon, P., Smith, S., & Ganapathy, V. (2009) Expression and localization of GPR109A (PUMA-G/HM74A) mRNA and protein in mammalian retinal pigment epithelium. *Molecular Vision*, 15, 362–372.
- Martinez-Moya, M., de Pedro, M. A., Schwartz, H., & Garcia-del Portillo, F. (1998) Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eucaryotic cells. *Research in Microbiology*, 149,309–318
- Masayuki, U., & Mogami, O. (2005) Milk Whey Culture With *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 Is Effective on the Colitis Induced by 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 329–334.
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., & Mackay, C. R. (2009) Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 1282-1287.
- Maslowski, K. M., & Mackay, C. R. (2011) Diet, gut microbiota and immune responses. *Nature immunology*, 12, 5-9.
- McGuckin, M. A., Eri, R., Simms, L. A., Florin, T. H., & Radford-Smith, G. (2009) Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Disease*, 15, 100–113.
- Medrano, M., Pérez, P. F., & Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 1-7.
- Medrano, M., Racedo, S. M., Rolny, I. S., Abraham, A. G., & Pérez, P. F. (2011) Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5299-5304.
- Meijer, K., de Vos, P., & Priebe, M. G. (2010) Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(6), 715–721.
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., & Bruewer, M. (2009) Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(5), G1140-G1149.
- Miguel, M. G. D. C. P., Cardoso, P. G., de Assis Lago, L., & Schwan, R. F. (2010) Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, 43(5), 1523-1528.



- Miquel, S., Martin, R., Rossi, O., Bermudez-Humaran, L. G., Chatel, J. M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., & Langella, P. (2013) *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), 255-261.
- Miyauchi, E., Ogita, T., Miyamoto, J., Kawamoto, S., Morita, H., Ohno, H., Suzuki, T., & Tanabe, S. (2013) *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS One*, 8(11), e79735.
- Mobili, P., Gerbino, E., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Formatex Research Center, Badajoz, 1224-1234.
- Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96, 795-803.
- Mortensen, F. V., Hesso, I., Birke, H., Korsgaard, N., & Nielsen, H. (1991) Microcirculatory and trophic effects of short chain fatty acids in the human rectum after Hartmann's procedure. *British Journal of Surgery*, 78, 1208-11.
- Motaghi, M., Mazaheri, M., Moazami, N., Farkhondeh, A., Fooladi, M. H., & Goltapeh, E. M. (1997) Short communication: Kefir production in Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 579-581.
- Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y., & Yamamoto, T. (2005) Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metabolism and Disposition*, 33(12), 1845-51.
- Murofushi, Y., Villena, J., Morie, K., Kanmani, P., Tohno, M., Shimazu, T., Aso, H., Suda, Y., Hashiguchi, K., Saito, T., & Kitazawa, H. (2015) The toll-like receptor family protein RP105/MD1 complex is involved in the immunoregulatory effect of exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* N14. *Molecular Immunology*, 64(1), 63-75.
- Nareika, A., He, L., Game, B. A., Slate, E. H., Sanders, J. J., London, S. D., Lopes-Virella, M. F., & Huang, Y. (2005) Sodium lactate increases LPS-stimulated MMP and cytokine expression in U937 histiocytes by enhancing AP-1 and NF-kappaB transcriptional activities. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 289(4), E534-E542.
- Neal-McKinney, J. M., Lu, X., Duong, T., Larson, C. L., Call, D. R., Shah, D. H., & Konkel, M. E. (2012) Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS ONE*, 7(9), e43928.
- Nehir, S. E. L., Karakaya, S., Simsek, S., Dupont, D., Menfaatlic, E., & Eker, A. T. (2015) *In vitro* digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method

- (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. *Food and Function*, 6, 2322-2330.
- Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., & Sirard, J. C. (2008) Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *Journal of Immunology*, 181(3),2036-43.
- Neumann E., Khawaja, K., & Müller-Ladner, U. (2014) G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nature Reviews Rheumatology*, 10, 429–436.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., & Strober, W. (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 1281-1290.
- Nielsen, O. H., & Munck, L. K. (2007) Drug insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, 4, 160-170.
- Obermeier, F., Kojouharoff, G., Hans, W., Scholmerich, J., Gross, V., & Falk, W. (1999) Interferon-gamma (IFN-g) - and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 116, 238-245.
- Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 25-42.
- Offermanns, S. (2014) Free Fatty Acid (FFA) and Hydroxy Carboxylic Acid (HCA) Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 407-434.
- Ohata, A, Usami, M., & Miyoshi, M. (2005) Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxygenase activation. *Nutrition*, 21, 838–847.
- Otles, S., & Cagindi, O. (2003) Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54–59.
- Otles, S., & Cagindi, O. (2012) Safety considerations of nutraceuticals and functional foods. In *Novel Technologies in Food Science* (pp. 121-136). Springer New York.
- Pasparakis, M. (2009) Regulation of tissue homeostasis by NF- $\kappa$ B signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature*, 9(11), 778-788.
- Pelto, L., Isolauri, E., Lilius, E. M., Nuutila, J., & Salminen, S. (1998) Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clinical & Experimental Allergy*, 28(12), 1474–1479.

- Perdigon, G., Maldonado Galdeano, C., Valdez, J. C., & Medici, M. (2002) Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 21–26.
- Philp N. J., Wang, D., Yoon, H., & Hjelmeland, L. M. (2003) Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44, 1716–1721.
- Pintado, M. E., Lopes Da Silva, J. A., Fernandes, P. B., Malcata, X. F., & Hogg, T. A. (1996) Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains. *International Journal of Food Science and Technology*, 31(1), 15-26.
- Pinto, M., Robine Leon, S., & Appay, M. D. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47(3), 323-330.
- Pourahmad, R., Moghimi, A., Dadkhah, S., & Assadi, M. M. (2011) Evaluation of flavor and aroma compounds amounts in kefir from soymilk. *World Applied Sciences Journal*, 15(5), 673-676.
- Powell, J. E., Witthuhn, R. C., Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007) Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17(3), 190-198.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. (2008) Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41, 111-123.
- Presser, K. A., Ratkowsky, D. A., & Ross, T. (1997) Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2355-2360.
- Puri, P., Mahapatra, S., Bijlani, R., Prasad, H., & Nath, I. (1994) Feed efficiency and splenic lymphocyte proliferation response in yogurt-and milk-fed mice. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 45(4), 231–235.
- Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., & Recio, I. (2005) Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3480-3487.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009) Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 101(4), 541-550.
- Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in Microbiology*, 12, 509–517.

- Rattray, F. P., & O'Connell, M. J. (2011) Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, pp. 518-524.
- Rea, M. C., Lennartsson, T., Dillon, P., Drina, F. D., Reville, W. J., Heapes, M., & Cogan, T. M. (1996) Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Microbiology*, 8, 83-94.
- Ridwan, B. U., Koning, C. J. M., Besselink, M. G. H., Timmerman, H. M., Brouwer, E. C., Verhoef, J., Gooszen, H. G., & Akkermans, L. M. (2008) Antimicrobial activity of a multispecies probiotic (Ecologic 641) against pathogens isolated from infected pancreatic necrosis. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 61-67.
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2001) Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 653-661.
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2003) Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. *Lait*, 83(1), 79-87.
- Roberfroid, M. B. (2005) Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S13-S25.
- Rodrigues, K. L., Gaudino Caputo, L. R., Tavares Carvalho, J. C., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 404-408.
- Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F., Vezza, T., Garrido-Mesa, N., Olivares, M., Comalada, M., Riccardi, C., Utrilla, M. P., Rodríguez-Cabezas, E., & Galvez, J. (2015) The viability of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 is not essential to exert intestinal anti-inflammatory properties. *Food and Function*, 6, 1176-1184.
- Roesler, K. & Rao, A. (2001) Rapid gastric fluid digestion and biochemical characterization of engineered proteins enriched in essential amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3443-3451.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., & Brauer, M. (1992) Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(5), 370-376.
- Romanin, D. E., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M. (2010) Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 102-108.
- Romanin D. (2013) Tesis Doctoral: "Modulación de la respuesta inmune innata epitelial por microorganismos potencialmente probióticos aislados de kefir". Facultad de Cs. Exactas. Dpto de Cs. Biológicas, UNLP.

- Romanin, D. E., Llopis, S., Genovés, S., Martorell, P., Ramón, V. D., Garrote, G. L & Rumbo, M. (2015) Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in *in vivo* models. *Beneficial Microbes*, 13, 1-12.
- Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X., Jin, F., & Wang, L. (2015) Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiology*, 15, 196.
- Rossland, E., Andersen Borge, G. I., Langsrud, T., & Sorhaug, T. (2003) Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 205-212.
- Roy, C. C., Kien, C. L., Bouthillier, L., & Levy, E. (2006) Short-chain fatty acids: Ready for prime time? *Nutrition in Clinical Practice*, 21, 351-366.
- Ruiz-Garcia, A., Monsalve, E., Novellasdemunt, L., Navarro-Sabaté, A., Manzano, A., Rivero, S., Castrillo, A., Casado, M., Laborda, J., Bartrons, R., & Díaz-Guerra, M. J. (2011) Cooperation of adenosine with macrophage Toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19247-19258.
- Rumbo, M., Sierro, F., Debar, N., Kraehenbuhl, J. P., & Finke, D. (2004) Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 127(1), 213-223.
- Salazar, N., López, P., Garrido, P., Moran, J., Cabello, E., Gueimonde, M., Suárez, A., González, C., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2014) Immune Modulating Capability of Two Exopolysaccharide-Producing Bifidobacterium Strains in a Wistar Rat Model. *BioMed Research International*.
- Samples, D., Ritcher, R. L., & Dill, C. W. (1984) Measuring Proteolysis in Cheddar Cheese Slurries: Comparison of Hull and Trinitrobenzene Sulfonic Acid Procedures. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 60-63.
- Samuvel, D. J., Sundararaj, K. P., Nareika, A., Lopes-Virella, M. F., & Huang, Y. (2009) Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *Journal of Immunology*, 182(4), 2476-2484.
- Santos, A., San Mauro, M., Sanchez, A., Torres, J. M., & Marquina, D. (2003) The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, 26(3), 434-437.
- Sarkar, S. (2007) Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. *British Food Journal*, 109, 280-290.

- Sartor, R. B. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134, 577–594.
- Sasaki, E., Suzuki, S., Fukui, Y., & Yajima, N. (2015) Cell-bound exopolysaccharides of *Lactobacillus brevis* KB290 enhance cytotoxic activity of mouse splenocytes. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2), 506-14.
- Satish-Kumar, C. S., Kondal Reddy, K., Reddy, A. G., Vinoth, A., Ch, S. R., Boobalan, G., & Rao, G. S. (2015) Protective effect of *Lactobacillus plantarum* 21, a probiotic on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *International Immunopharmacology*, 25(2), 504-10.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Saxelin, M., Korpela, R., & Mäyrä-Mäkinen, A. (2003) Classifying Functional Dairy Products. Capítulo 1 en: Functional Dairy Products. Eds: Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. CRS Press. Cambridge.
- Schägger, H. (2006) Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1(1): 16-23.
- Schaub, A., Fütterer, A., & Pfeffer, K. (2001) PUMA-G, an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily. *European Journal of Immunology*, 31(12), 3714–3725.
- Schiffrin E. J. & Blum S. (2002) Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, S60–S64.
- Schmidt, J., Smith, N. J., Christiansen, E., Tikhonova, I. G., Grundmann, M., Hudson, B. D. Wards, R. J., Drewkw, C., Milligan, G., Kostenis, E., & Ulven, T. (2011) Selective Orthosteric Free Fatty Acid Receptor 2 (FFA2) Agonists. IDENTIFICATION OF THE STRUCTURAL AND CHEMICAL REQUIREMENTS FOR SELECTIVE ACTIVATION OF FFA2 VERSUS FFA3. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(12), 10628-10640.
- Schoeni, J. L., & Lee Wong, A. C. (2005) *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68, 636–648.
- Schreiber, S., Nikolaus, S., & Hampe, J. (1998) Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*, 42, 477-484.
- Schrezenmeir, J., & De Vrese, M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 361S-364S.
- Scott, K.P., Duncan, S. H., & Flint, H. J (2008) Dietary fibre and the gut microbiota. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 33, 201–211.



- Scrimshaw, N. S., & Murrar, E. B. (1988) The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48(SUPPL.), 1083-1159.
- Sengupta, S., Muir, J. G., & Gibson, P. R. (2006) Does butyrate protect from colorectal cancer? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(1Pt 2), 209-218.
- Senol, A., Isler, M., Sutcu, R., Akin, M., Cakir, E., Ceyhan, B. M., & Kockar, M. C. (2015) Kefir treatment ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 21(46), 13020-13029.
- Servin, A. L., & Coconnier, M. H. (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 741-754.
- Servin, A. L. (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405-440.
- Shanahan, F., & Quigley, E. M. (2014) Manipulation of the microbiota for treatment of IBS and IBD-challenges and controversies. *Gastroenterology*, 146, 1554-1563.
- Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., & Aibara, K. (1982) Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 35(2), 75-80.
- Shu, Q., & Gill, H. S. (2002) Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34(1), 59-64.
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *Internacional Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009) Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 316-325.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002) Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 1-6.
- Simova, E., Simov, Z., Beshkova, D., Frengova, G., Dimitrov, Z., & Spasov, Z. (2006) Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 112-123.
- Sinagra, E., Tomasello, G., Cappello, F., Leone, A., & Cottone, M. (2013) Probiotics, prebiotics and symbiotics in inflammatory bowel diseases: state-of-the-art and new insights. *Journal of BIOLOGICAL REGULATORS & Homeostatic Agents*, 27, 919-933.

- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P. D., Manicassamy, S., Munn, D. H., Lee, J. R., Offermanns, S., & Ganapathy, V. (2014) Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis. *Immunity*, 40, 128–139.
- Skeie, S., Kieronczyk, A., Næss, R. M., & Østlie, H. (2008) *Lactobacillus* adjuncts in cheese: Their influence on the degradation of citrate and serine during ripening of a washed curd cheese. *International Dairy Journal*, 18(2), 158–168.
- Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly, Y., Glickman, J. N., & Garrett, W.S. (2013) The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic T reg cell homeostasis. *Science*, 341(6145), 569–573.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., & Langella, P. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gutmicrobiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(43), 16731–16736.
- Southgate, D. A. (1976) Selected methods In Determination of Food Carbohydrates. Applied Science Publishers Ltd. Essex, UK. 99–144.
- St-Onge, M. P., Farnworth, E. R., Savard, T., Chabot, D., Mafu, A., & Jones, P. J. H. (2002) Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: A randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, art. N° 1.
- Stetinova, V., Smetanova, L., Kvetina, J., Svoboda, Z., Zidek, Z., & Tlaskalova-Hogenova, H. (2010) Caco-2 cell monolayer integrity and effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 components. *Neuro Endocrinology Letters*, 31, 51–56.
- Strober, W., Kelsall, B., Fuss, I., Marth, T., Ludviksson, B., Ehrhardt, R., & Neurath, M. (1997) Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunology Today*, 18(2), 61–64.
- Swidsinski, A., Ladhoff, A., Pernthaler, A., Swidsinski, S., & Loening-Baucke, V. (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122, 44–54.
- Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Barłowska, J., Król, J., & Litwińczuk, Z. (2011) Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system – a review. *Animal Science Papers and Reports*, 29(4), 269–280.
- Takizawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S., Benno, Y., & Nakase, T. (1994) *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 435–439.



- Tamime, A. Y. (2006) Production of kefir, koumiss and other related products. In: Tamime, AY (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, pp. 174-216.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014) The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*, 121, 91-119.
- Tan, Z., Xie, N., Banerjee, S., Cui, H., Fu, M., Thannickal, V. J., & Liu, G. (2015) The monocarboxylate transporter 4 is required for glycolytic reprogramming and inflammatory response in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 290(1), 46-55.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C. T., Lin, H., Masters, S. L., Gottlieb, E., Kelly, V. P., Clish, C., Auron, P. E., Xavier, R. J., & O'Neill, L. A. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496(7444), 238-42.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007) Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13, 2826-2832.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012) Pathogenesis and toxins. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18, 530-538.
- Tellez, A., Corredig, M., Turner, P. V., Morales, R., & Griffiths, M. (2011) A peptidic fraction from milk fermented with *Lactobacillus helveticus* protects mice against *Salmonella* infection. *International Dairy Journal*, 21, 607-614.
- Thangaraju, M., Cresci, G. A., Liu, K., Ananth, S., Gnanaprakasam, J. P., Browning, D. D., Mellinger, J. D., Smith, S. B., Digby, G. J., Lambert, N. A., Prasad, P. D., & Ganapathy, V. (2009) GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer Research*, 69(7), 2826-2832.
- Tojo Sierra, R., & Leis Trabazo, R. (2003) Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. *Boletín de pediatría*, 43, 376-395.
- Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y. S., Parker, H. E., Habib, A. M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2012) Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61(2), 364-371.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., & Rescigno, M. (2012) Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut*, 61, 1007-1015.

- Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., & Westendorf, A. M. (2007) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE*, 2(12), e1308.
- Urdaneta, E., Barrenetxe, J., Aranguren, P., Irigoyen, A., Marzo, F., & Ibáñez, F. C. (2007) Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutrition Research*, 27(10), 653-658.
- Usami, M., Kishimoto, K., Ohata, A., Miyoshi, M., Aoyama, M., Fueda, Y., & Kotani, J. (2008). Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor  $\kappa$ B activation and tumor necrosis factor  $\alpha$  secretion and increase prostaglandin E 2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition Research*, 28(5), 321-328.
- Vásquez Mejía, S. M., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). Use of antimicrobial substances produce by acid lactic bacterias on meat conservation. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71.
- Vass, A., Szakaly, S., & Schmidt, P. (1983) Experimental study of the nutritional biological characters of fermented milks. *Acta Medica Hungarica*, 41(2-3), 157-161.
- Veiga, P., Pons, N., Agrawal, A., Oozeer, R., Guyonnet, D., Brazeilles, R., Faurie, J. M., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Houghton, L. A., Whorwell, P. J., Ehrlich, S. D., & Kennedy, S. P. (2014) Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Nature Scientific Reports*, 4, 6328.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R.A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304-1351.
- Vernia, P., Caprilli, R., Latella, G., Barbetti, F., Magliocca, F. M., & Cittadini, M. (1988) Fecal lactate and ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 95(6), 1564-1568.
- Villena, J., & Kitazawa, H. (2014) Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Frontiers in Immunology*, 4, 512.
- Vinderola, G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C. (2005) Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72(2), 195-202.
- Vinderola, G., Perdigón, G., Duarte, J., Farnworth, E., & Matar, C. (2006a) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36(5-6), 254-260.
- Vinderola, G., Perdigon, G., Duarte, J., Thangavel, D., Farnworth, E., & Matar, C. (2006b). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, 211(3), 149-156.

- Vinderola, G., Matar, C., & Perdígón, G. (2007) Milk fermentation products of *L. helveticus* R389 activate calcineurin as a signal to promote gut mucosal immunity. *BMC Immunology*, 8, 19.
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Nachbar, R. T., & Curi, R. (2011a) Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3, 858-876.
- Vinolo, M. A. R., Rodrigues, H. G., Hatanaka, E., Sato, F. T., Sampaio, S. C., & Curi, R. (2011b) Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 849-855.
- Vujicic, I. F., Vulic, M., & Konyves, T. (1992) Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*, 14(9), 847-850.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008a) Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 587-593.
- Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Veeriah, S., Will, F., Dietrich, H., Pool-Zobel, B. L., & Schrenk, D. (2008b). Histone-deacetylase inhibition and butyrate formation: Fecal slurry incubations with apple pectin and apple juice extracts. *Nutrition*, 24(4), 366-374.
- Wan, Y. M., Zhu, Y. Q., Xia, B., & Luo, J. (2011) Treating TNBS-induced colitis in rats with probiotics. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 22(5), 486-93.
- Wanders, D., Graff, E. C., & Judd, R. L. (2012) Effects of high fat diet on GPR109A and GPR81 gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 425(2), 278-283.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., & Inoue, J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346-351.
- Wang, S. Y., Chen, H. C., Liu, J. R., Lin, Y. C., & Chen, M. J. (2008) Identification of yeasts and evaluation of their distribution in taiwanese kefir and viili starters. *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3798-3805.
- Wang, X., He, G., Peng, Y., Zhong, W., Wang, Y., & Zhang, B. (2015) Sodium butyrate alleviates adipocyte inflammation by inhibiting NLRP3 pathway. *Scientific Reports – Nature*, 5, 12676.
- Watanabe, T., Nishio, H., Tanigawa, T., Yamagami, H., Okazaki, H., Watanabe, K., Tominaga, K., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Asahara, T., Nomoto, K., Higuchi, K., Takeuchi, K., & Arakawa, T. (2009) Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: Involvement of lactic acid. *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297(3), G506-G513.
- Werner, T., & Haller, D. (2007) Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: from the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutation Research*, 1, 42-57.

- Wise, A., Foord, S. M., Fraser, N. J., Barnes, A. A., Elshourbagy, N., Eilert, M., Ignar, D. M., Murdock, P. R., Stepkowski, K., Green, A., Brown, A. J., Dowell, S. J., Szekeres, P. G., Hassall, D. G., Marshall, F. H., Wilson, S., & Pike, N. B. (2003) Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9869–9874.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005) Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15, 383-389.
- Wójtowski, J., Danków, R., Skrzypek, R., & Fahr, R. (2003) The fatty acid profile in kefirs from sheep, goat and cow milk. *Milchwissenschaft*, 58(11-12), 633-636.
- Wszolek, M., Tamime, A. Y., Muir, D. D., & Barclay, M. N. I. (2001) Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *LWT – Food Science and Technology*, 34, 251-261.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., & Chomicz, S. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C125-C136.
- Wu, M. H., Pan, T. M., Wu, Y. J., Chang, S. J., Chang, M. S., & Hu, C. Y. (2010). Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A. 1 macrophages) and antimicrobial properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 104-110.
- Wyder, M., Spillmann, H., & Puhani, Z. (1997) Investigation of the yeast flora in dairy products: A case study of kefir. *Food Technology and Biotechnology*, 35(4), 299-304.
- Xiong, Y., Miyamoto, N., Shibata, K., Valasek, M. A., Motoike, T., Kedzierski, R. M., & Yanagisawa, M. (2004) Short-chain fatty acids stimulate leptin production in adipocytes through the G protein-coupled receptor GPR41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101(4), 1045-1050.
- Yoon, Y. H., Cho, J. K., Baek, Y. J., & Huh, C. S. (1999) Antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains. *Korean Journal of Animal Science*, 41, 39-44.
- Yoon, H., Yoon, Y-S., Kim, M-S., Chung, M-J., & Yum, D-Y. (2014) A probiotic preparation Duolac-Gold ameliorates dextran sulphate sodium-induced mouse colitis by downregulating the expression of IL-6. *Toxicology Research*, 30 (1), 27-32.
- Yoshida, T., & Toyoshima, K. (1994) Lactic acid bacteria and yeast from kefir. *Japan Society of Nutrition and Food Science*, 47, 55-59.

- Yoshida, Y., Yokoi, W., Ohishi, K., Ito, M., Naito, E., & Sawada, H. (2005) Effects of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(4), 714-723.
- Yousefi, S., Cooper, P. R., Mueck, B., Potter, S. L., & Jarai, G. (2000) cDNA representational difference analysis of human neutrophils stimulated by GM-CSF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2), 401-409.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., & Aslım, B. (2004a) Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from turkish kefir with natural probiotic. *LWT- Food Science and Technology*, 37(6), 663-667.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., & Aslım, B. (2004b) Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Nahrung*, 48, 218-220.
- Zagato, E., Mileti, E., Massimiliano, L., Fasano, F., Budelli, A., Penna, G., & Rescigno, M. (2014) *Lactobacillus paracasei* CBA L74 Metabolic Products and Fermented Milk for Infant Formula Have Anti-Inflammatory Activity on Dendritic Cells In Vitro and Protective Effects against Colitis and an Enteric Pathogen In Vivo. *PLoS ONE*, 9(2), 87615.
- Zhou, J., Liu, X., Jiang, H., & Dong, M. (2009) Analysis of the microflora in tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26(8), 770-775.
- Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J., & Dong, C. (2005) Inactivation of monocarboxylate transporter MCT3 by DNA methylation in atherosclerosis. *Circulation*, 112(9), 1353-61.
- Zimmerman, M. A., Singh, N., Martin, P. M., Thangaraju, M., Ganapathy, V., Waller, J. L., Shi, H., Robertson, K. D., Munn, D. H., & Liu, K. (2012) Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(12), G1405-G1415.
- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2008) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 18-26.
- Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R., & Boccio, J. (2001) Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*, 21(3), 569-579.
- Zuo, L., Yuan, K. T., Yu, L., Meng, Q. H., Chung, P. C., & Yang, D. H. (2014) *Bifidobacterium infantis* attenuates colitis by regulating T cell subset responses. *World Journal of Gastroenterology*, 20(48), 18316-29.

- Zweig, G., & Sherma, J. (1978) Section A: General Data and Principles Volume II. En: Handbook Series in Chromatography. CRC Press Inc., Florida. p. 124-130.
- Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., & Schmidt, M.A. (2007) Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular Microbiology*, 9, 804-816.





## Evaluación de la actividad biológica de leches fermentadas artesanales: función de la fracción no microbiana

Los productos lácteos constituyen excelentes matrices para la incorporación de probióticos. Las propiedades bioactivas de los mismos podrían asociarse a los microorganismos por si mismos o a los metabolitos que ellos producen durante la fermentación. La identificación de los ingredientes bioactivos es uno de los principales objetivos en la ciencia de los alimentos funcionales.

En el presente trabajo se caracterizó la fracción no microbiana de leche fermentada con gránulos de kefir con la finalidad de evaluar su actividad biológica e identificar los componentes responsables de la misma.

El ácido láctico en su forma no disociada fue el principal responsable de la actividad antimicrobiana de la leche fermentada y el lactato ejerció un rol protagónico en la capacidad de modular la respuesta inmune innata epitelial asociada a la fracción no microbiana de kefir.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan una nueva perspectiva para el análisis de las propiedades biológicas de productos fermentados y valorizan el rol del lactato como componente alimenticio que contribuye a la promoción de la salud.

